



Événements moléculaires chez *Lycopersicon esculentum* après exposition à des rayonnements électromagnétiques haute fréquence

David Roux

► To cite this version:

David Roux. Événements moléculaires chez *Lycopersicon esculentum* après exposition à des rayonnements électromagnétiques haute fréquence. Biologie végétale. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2008. Français. NNT : 2008CLF21829 . tel-00728379

HAL Id: tel-00728379

<https://theses.hal.science/tel-00728379>

Submitted on 5 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
N° d'ordre 479

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires (Biologie Végétale)

Soutenue le 11 avril

David ROUX

Événements moléculaires chez
Lycopersicon esculentum après exposition à des
rayonnements électromagnétiques haute fréquence

Président :

M. Michel Thellier, Professeur, Université de Rouen, Membre de l'Académie des Sciences

Rapporteurs :

M. Michel Thellier, Professeur, Université de Rouen, Membre de l'Académie des Sciences

M. Jean-Marie Frachisse, Chargé de Recherches CNRS, ISV - Gif-sur-Yvette

Examineurs :

Mme Françoise Paladian, Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

M. Eric Davies, Professeur, North Carolina State University

M. Gérard Ledoigt, Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

M. Alain Vian, Maître de Conférence, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

*À Aurore,
à mes parents.*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier vivement Alain Vian, Maître de Conférence à l'Université Blaise Pascal, pour ses enseignements et son encadrement scientifique, riches et « rigoureux ». Durant un peu plus de quatre années, il m'a largement permis (et conseillé) de m'investir dans les projets scientifiques en cours autant au niveau expérimental qu'au niveau de leur valorisation à travers des publications. Cette démarche a réussi à entretenir ma motivation pour l'étude des effets des champs électromagnétiques sur le vivant, et surtout, elle a conduit à l'aboutissement de mon travail de thèse dans des conditions confortables.

Je remercie toute l'équipe de physiciens du LASMEA : Sébastien Girard, Sébastien Lalléchère, Fatou Diouf, Pierre Bonnet et Françoise Paladian dont la gentillesse, la disponibilité et les travaux représentent également une part importante de la bonne conduite de cette thèse.

Je remercie mon directeur de thèse, Gérard Ledoigt, Professeur à l'Université Blaise Pascal, qui m'a permis de mener ce projet au sein du laboratoire ERTAC, en toute liberté, ainsi que pour ses appréciations. Je remercie au passage Yolande, secrétaire du laboratoire, pour sa sympathie.

Je remercie Mme Faure, M. Rechat et M. Chastaing, maintenant à la retraite, pour leur gentillesse, leur aide technique et leurs « bricolages » très professionnels.

Je remercie le Professeur Michel Thellier, M. Jean-Marie Frachisse et le Professeur Eric Davies d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse, ainsi que pour leurs appréciations très positives.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué quelque part à cette thèse, notamment Nelly LAJOINIE, Isabelle Jouan, Michel Gendraud et Marie-Antoinette.

Enfin, ont également contribué à ce que ce travail aboutisse : l'entreprise OCP (Organisme de distribution de produits pharmaceutiques) au sein de laquelle j'ai travaillé un semestre ainsi que la Bibliothèque Numérique de l'Université Blaise Pascal où j'ai pu exercer et développer mes connaissances en informatique pour Internet durant une année (en compagnie de collègues sympathiques).

Je remercie également les personnes qui m'ont permis d'obtenir un post d'ATER, ce qui m'a mis dans une situation très confortable pour finaliser mon travail de thèse.

Je termine par remercier les structures suivantes qui contribuent tous les jours à l'avancement et à la qualité de nos travaux : Google [www.google.fr], le NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov] et l'EMF-Portal [www.emf-portal.de].

"Si la vie n'est qu'un passage, sur ce passage au moins semons les fleurs" (Montaigne)

TABLE DES MATIERES

Introduction ::	12
Synthèse Bibliographique ::	15
1. Contexte	16
2. Avancées	19
2.1. Études sanitaires	19
2.2. Données expérimentales	21
2.3. Modulation des signaux GSM	23
2.4. Matériel expérimental	24
3. Les champs électromagnétiques	26
3.1. Définitions	26
3.2. Grandeurs et Unités	29
3.3. Cas particulier de la téléphonie mobile	30
4. La notion de stress chez les plantes	31
4.1. Sensibilité des plantes à leur environnement	31
4.2. Mécanismes	33
4.3. Les plantes et les CEM	40
5. Approche expérimentale	41
Matériel et Méthodes ::	42
1. Plan expérimental	43
2. Matériel Végétal	44
2.1. Conditions de culture	44
2.2. Modification du milieu de culture	46
2.3. Récolte du matériel végétal et chronologie	47
3. Stimulation Électromagnétique	49
3.1. La Chambre Réverbérante à Brassage de Modes	49
3.2. Caractérisation du CEM	51
4. Matrices pour la PCR quantitative	53
4.1. Extraction des ARN Totaux	54
4.2. Extraction des ARN polysomiques	55
4.3. Dosage et qualité des ARN	55
4.4. Synthèse des ADN complémentaires	56
5. PCR quantitative en temps réel	57
5.1. Amorces PCR	57
5.2. Méthode d'analyse	60

5.3. Efficacités d'amplification	62
6. Charge énergétique adénylique	64
6.1. Extraction des nucléotides libres	64
6.2. Dosage de l'ATP	64
6.3. Dosage enzymatique des nucléotides : principe	64
6.4. Dosages enzymatiques des nucléotides : préparation	66
Résultats ::	67
1. Caractérisations et validations expérimentales	68
1.1. Caractérisation des champs électromagnétiques	68
1.2. Prérequis à la PCR quantitative	71
1.3. Mesure de la température au cours de l'exposition EM	73
2. Abondance d'ARNm en réponse au CEM HF	74
3. Effets de la modulation du calcium	81
4. Devenir des ARNm cibles sous influence du CEM HF	83
5. Effet du CEM HF sur l'état énergétique cellulaire	85
Discussion ::	90
1. Analogie CEM HF / stimulus environnemental	91
1.1. Abondances d'ARN messagers cibles	92
1.2. Devenir des ARNm	97
1.3. Etat énergétique général	101
2. Précision de l'interaction CEM HF / plante	105
2.1. Rôle de la température	105
2.2. Modifications du traitement EM (durée / amplitude)	106
2.3. Modulation de la concentration du milieu en calcium	108
3. Mécanismes de perception et de transduction	111
3.1. Les membranes comme sites privilégiés d'interaction	111
3.2. Autres interactions	114
4. Démarche et limites	118
4.1. Importance des conditions expérimentales	118
4.2. Limites de l'étude	121
Conclusion et Perspectives ::	122
Annexes ::	127
Références Bibliographiques ::	137
Publications ::	148

ABREVIATIONS

ADN c : acide désoxyribonucléique (c) complémentaire
ADP : adénosine diphosphate
AMP : adénosine monophosphate
ARN m : acide ribonucléique (m) messenger
ATP e : adénosine triphosphate (e) extracellulaire
BAPTA : acide 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
CCCP : carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
CDPK : calcium dependent protein kinase
CEA : charge énergétique adénylique
CEM HF : champ (EM) électromagnétique (HF) haute fréquence
CRBM : chambre réverbérante à brassage de modes
EGTA : ethylene glycol tetraacetic acid
GSM : global system for mobile communications
HSP : heat shock protein
IP₃ : inositol-1-4-5-triphosphate
LaCl₃ : chlorure de lanthane
PCR : polymerase chain reaction
Qr : quantité relative
RTqPCR : real time quantitative PCR
UI : unités de luminescence

SIGLES

AFOM : Association Française des Opérateurs Mobiles
AFSSE : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement
ANFR : Agence Nationale des Fréquences
CENELEC : Comité Européen de la Normalisation Electrotechnique
ICNIRP : International Commission for Non Ionizing Radiation Protection
MAPHYS : Micropuce à ADN pour l'étude PHYSiologique
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

NOMENCLATURES

actin : actin isoform B
calm-n6 : calmodulin N6
cmbp : chloroplast mRNA binding protein
lebzip1 : *Lycopersicon esculentum* basic leucine zipper 1
lecdpk1 : *Lycopersicon esculentum* calcium dependent protein kinase 1
pin2 : proteinase inhibitor type II

ILLUSTRATIONS

Figure 1 : matériels utilisés pour l'expérimentation EM.	25
Figure 2 : représentation d'une onde électromagnétique.	27
Figure 3 : illustration des propriétés d'un champ électromagnétique.	28
Figure 4 : spectre des rayonnements électromagnétiques.	28
Figure 5 : rôle des messagers secondaires lipidiques dans l'initiation de la réponse cellulaire.	34
Figure 6 : étapes de réponse d'une cellule végétale à un stimulus.	37
Figure 7 : synoptique expérimental.	43
Figure 8 : dispositif de culture hydroponique des plantes.	45
Figure 9 : schéma d'une chambre de culture.	45
Figure 10 : chronologie des expériences.	48
Figure 11 : schéma et photographie de la Chambre Réverbérante à Brassage de Modes.	50
Figure 12 : schéma de l'équipement technique de la CRBM.	50
Figure 13 : caractérisation du CEM dans un volume utile.	52
Figure 14 : situation des différents marqueurs étudiés au sein de la cellule.	54
Figure 15 : principe de la PCR quantitative en temps réel.	59
Figure 16 : calcul simplifié de la quantité relative (Qr).	61
Figure 17 : homogénéité et isotropie du CEM au sein de la CRBM à vide.	69
Figure 18 : homogénéité et isotropie du CEM au sein d'une chambre de culture.	69
Figure 19 : champ électrique résiduel à l'intérieur des caissons de culture.	70
Figure 20 : détermination de la température d'hybridation optimale pour le marqueur lebzip1.	72
Figure 21 : test d'efficacité d'amplification des couples d'amorces lecdpk1 / actin.	72
Figure 22 : mesures de température au cours des essais.	73
Figure 23 : abondance relative moyenne des ARNm « proteinase inhibitor II ».	76
Figure 24 : modifications du traitement électromagnétique.	76
Figure 25 : abondance relative moyenne des ARNm « Lycopersicon esculentum bZIP 1 ».	78
Figure 26 : abondance relative moyenne des ARNm « Chloroplaste-mRNA-binding-Protein ».	78

Figure 27 : abondance relative moyenne des ARNm « calmoduline-n6 ».	79
Figure 28 : abondance relative moyenne des ARNm « calcium dependent protein kinase ».	79
Figure 29 : abondance relative moyenne des ARNm « actin isoforme B ».	80
Figure 30 : variation de la concentration en calcium.	82
Figure 31 : prise en charge des ARNm.	84
Figure 32 : évolution de la concentration en ATP.	86
Figure 33 : évolution de la concentration relative en nucléotides adényliques (ATP + ADP + AMP).	86
Figure 34 : évolution de la Charge Energétique Adénylique (CEA).	87
Figure 35 : effet du CCCP sur la concentration en ATP.	87
Figure 36 : effets d'un découplant sur les réponses moléculaires observées.	89
Figure 37 : abondance relative moyenne de quatre ARNm.	93
Figure 38 : comparaison des accumulations relatives de trois transcrits.	99
Figure 39 : schéma de synthèse.	124

TABLEAUX

Tableau 1 : liste des couples d'amorces PCR utilisés.	59
Tableau 2 : dosages enzymatiques des nucléotides.	66
Tableau 3 : composition des milieux de culture modifiés.	81
Tableau 4 : réponse des plantes en fonction de l'énergie transmise.	107
Tableau 5 : effet de la concentration en calcium sur l'accumulation des transcrits.	109

INTRODUCTION ::

A l'heure actuelle, personne n'ignore l'importance des technologies de communication sans fil dans les sociétés modernes et plus particulièrement la téléphonie mobile. Leur utilisation est de plus en plus répandue tout comme les résultats paradoxaux associés à leurs effets sur la santé. De nombreux questionnements sont nés du fait que ces appareils utilisent des champs électromagnétiques de faible amplitude et de haute fréquence pour communiquer entre eux. La thématique du « bioélectromagnétisme » s'est ainsi considérablement développée depuis une quinzaine d'années, concernant essentiellement les domaines de physique et de biologie mais également beaucoup d'études conduites par des médecins sur la santé des utilisateurs. Il est possible d'opposer deux grands types d'approches qui n'ont pas les mêmes finalités :

- les travaux qui s'établissent en terme de risque, focalisés le plus souvent à long terme sur des questions sanitaires et/ou dosimétriques.
- les études expérimentales et physiologiques fondées sur l'analyse de paramètres biologiques simples.

Les démarches du premier groupe sont nécessaires compte tenu des enjeux vis-à-vis de la population, mais plusieurs aspects concrets de la relation CEM HF / effets biologiques restent flous. Ceux-ci sont alors abordés par les approches expérimentales et c'est dans ce cadre que se situe notre travail, au travers duquel nous avons voulu déterminer s'il est possible d'établir un lien direct de cause à effet entre l'irradiation d'un organisme vivant par un champ électromagnétique (de haute fréquence et de faible amplitude) et une réponse biologique, ceci à très court terme. Il est encore assez peu fréquent d'observer de telles corrélations dans la littérature.

Nous abordons ce problème par l'exposition de plants de tomate à un CEM de courte durée (2 à 10 min), de faible amplitude (5 à 40 V.m⁻¹) et dont la fréquence est l'une des plus utilisées par la téléphonie mobile (900 MHz). Notre hypothèse de travail est l'analogie avec un stimulus environnemental, qui doit être observée au niveau de la réponse moléculaire si le CEM HF est effectivement perçu par la plante.

Nous avons associé un organisme vivant Eucaryote (*Lycopersicon esculentum*) à un système de stimulation électromagnétique contrôlé et protégé (CRBM) afin de mesurer à court terme les variations de paramètres biologiques précis.

Cette étude a été précédée d'un DEA au cours duquel différentes approches et techniques ont été développées et testées, apportant quelques bases de travail, notamment le mode de culture des plantes, le traitement au sein de la chambre réverbérante à brassage de mode (CRBM) ainsi que l'analyse par PCR quantitative.

Ce travail s'est déroulé à l'Université Blaise-Pascal dans le cadre du programme « Effet des rayonnements électromagnétiques haute fréquence non ionisants sur les organismes vivants » (projet RTM 0005, ACI « Effets biologiques et sanitaires de la radiotéléphonie mobile » 2003-2006, coordinateur : Pr. G. Ledoigt) développé au sein de l'équipe d'accueil ERTAC (Equipe de Recherche sur les Tumeurs et l'Autosurveillance Cellulaire, EA 3296), en étroite collaboration avec le Laboratoire des Sciences et Matériaux pour l'Electronique et d'Automatique (UMR-CNRS 6602 LASMEA, Equipe du Pr. F. Paladian). Le contexte créé a permis de réunir un laboratoire dont les thématiques sont axées sur les relations que développent les plantes avec leur environnement et un laboratoire de physique possédant les compétences nécessaires à la mise en oeuvre des CEM HF comme moyen de stimulation.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ::

1. Contexte

L'utilisation des technologies sans fil a connu une croissance exponentielle avec la généralisation des téléphones mobiles depuis 1990. En 2007, selon l'Association Française des Opérateurs Mobiles (AFOM), 52 millions de ces appareils sont quotidiennement utilisés en France (plus d'1,6 milliard dans le monde), 78 % des foyers en sont équipés et les différents réseaux couvrent 98 % de la population (AFOM, 2007). Pour communiquer, ces technologies utilisent des champs électromagnétiques (CEM) haute fréquence (HF) de faible amplitude. L'utilisation grandissante de ces appareils est le principal moteur de leurs progrès, faisant fréquemment apparaître de nouveaux systèmes : téléphonie troisième génération (3G), accès Internet « Wireless Fidelity » (WiFi) domestiques et publics, périphériques bluetooth, etc. Ces matériels utilisent maintenant une plage de fréquence s'étalant de 800 à 2400 MHz.

Les problèmes posés par les effets des CEM artificiels existent depuis le milieu du XX^{ème} siècle, avec les premiers travaux s'intéressant aux effets des CEM basse fréquence émis par le courant électrique domestique (50-60 Hz) et les lignes haute tension. Ces fréquences sont toujours très étudiées, notamment en environnement urbain (Paniagua *et al.*, 2006), mais les travaux concernant les CEM HF, plus énergétiques, sont de plus en plus nombreux. La Commission Internationale de Protection contre les Rayonnements Non Ionisants (ICNIRP), compétente dans ce domaine, détermine les seuils d'exposition de la population en se basant sur les résultats d'un grand nombre de travaux. Les premières limites d'exposition des populations aux CEM HF, proposées par cette commission en 1998 (ICNIRP, 1998), ont été adoptées en 1999 par la Commission Européenne (1999/5/CE). Cela a ensuite donné lieu en 2001 à une norme harmonisée (EN 50360:2001) produite par le Comité Européen de Normalisation Electrotechnique (CENELEC², 2001) puis à un décret au niveau de la réglementation française en 2002 (2002-775). Le renouvellement de ces limites est à l'étude avant publication d'un nouveau rapport par l'ICNIRP (Roy, 2007).

Les seuils d'exposition actuels se basent sur le principe suivant : l'ajout d'un facteur de précaution (fixé arbitrairement) de 50 sur la limite à partir de laquelle un effet « thermique » est perçu (typiquement une hausse d'1°C de la température d'un volume de tissu biologique). Ces seuils prennent les effets thermiques du CEM HF comme références car ce sont les seules conséquences formellement avérées. Néanmoins, nombre de réponses biologiques observées sont indépendantes d'une hausse directe de la température causée par le champ, ce qui fait parallèlement apparaître la notion importante des « effets athermiques », observés pour de faibles puissances de CEM. Cela soulève également la question polémique (Adair, 2003), et pour l'instant sans réponse claire, du mode d'interaction de ces champs avec les organismes vivants sous les limites d'exposition.

Le décret français (2002-775) stipule que les limites d'exposition pour les fréquences comprises entre 400 et 2000 MHz s'obtiennent avec les formules suivantes :

- champ électrique en volts par mètre = **$1,375 \times \text{fréquence}^{0,5}$ (MHz).**
- densité de puissance en watts par mètre carré = **$\text{fréquence (MHz)} / 200$.**

Ce qui correspond, par exemple, pour la fréquence de ± 900 MHz, à une limite en densité de puissance de $4,5 \text{ W.m}^{-2}$ et à un champ électrique de 41 V.m^{-1} . Les stations relais tout comme les téléphones portables exposent les utilisateurs à des valeurs moyennes de champ toujours inférieures à ces limites (AFFSE², 2005). Selon l'Agence Nationale des Fréquences (ANFR, 2004), les stations relais émettent des CEM avec des puissances très importantes à leur proximité mais qui sont largement diffusées puisque ces antennes, placées en moyenne à 15 m du sol, ont une dispersion essentiellement horizontale (leur construction limite considérablement la diffusion verticale). De même, une étude montre que les téléphones mobiles, contrôlés par les logiciels internes, fonctionnent la plupart du temps à puissance maximale sans être influencés par le contexte (par exemple la distance au relais), dans le but d'optimiser le trafic des communications (Ardoïno *et al.*, 2004).

En environnement urbain, les multiples sources de CEM conduisent à des phénomènes d'interférence, de réflexion et de diffraction ce qui donne localement lieu à des variations très importantes de la puissance d'exposition (Valberg *et al.*, 2007). Cependant, la puissance du CEM HF diminue de manière très importante avec la distance à l'émetteur (AFFSE² 2005 ; Valberg *et al.*, 2007) ce qui fait que les densités de puissance moyennes mesurées au cœur des agglomérations dépassent rarement les 20 mW.m⁻² (Ministère de la Santé, 2001) et restent assez faibles au regard des recommandations (moins de 1/200^e de la limite d'exposition fixée). Néanmoins, des réponses biologiques concrètes sont déjà décrites sous ces gammes de puissance, par exemple des effets sur la fertilité des rats à partir de valeur de champs de l'ordre de 1 mW.m⁻² (Magras et Xenos, 1997). Les études se focalisent, pour la plupart, sur des puissances de CEM inférieures aux limites d'exposition internationales et relatent des effets athermiques. C'est le cas, par exemple, de deux études régulièrement citées par les rapports : sur le système nerveux (Westerman et Hocking, 2004) ou sur la perméabilité de la barrière hémato céphalique de rats (Salford *et al.*, 1994).

Bien que l'ensemble de la population soit exposée continuellement à des CEM HF de plus ou moins faible puissance, une publication récente de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement (AFSSE, 2005) souligne que les travaux actuels (épidémiologiques et expérimentaux) ne permettent pas de conclure à la nocivité de ces rayonnements. Il ressort que le recul n'est pas suffisant puisque l'utilisation massive du « sans fil » date seulement d'une dizaine d'années. L'exposition passive aux CEM HF de faible amplitude ne présente pas non plus de nocivité démontrée à l'heure actuelle mais l'utilisation prolongée de ces technologies associée à la proximité des émetteurs font que L'AFSSE comme l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ainsi que plusieurs revues (Feychting *et al.*, 2005) recommandent la mise en œuvre du principe de précaution. Le ministère français de la santé publique a émis un communiqué de presse à ce propos le 2 janvier 2008. Ces organismes suggèrent de poursuivre les travaux dans ce domaine en préférant l'étude de paramètres biologiques précis plutôt que comportementaux ou épidémiologiques (OMS, 2000 ; AFSSE², 2005).

2. Avancées

2.1. Études sanitaires

L'effet des CEM sur le vivant est généralement abordé par des études axées sur la population. Sont particulièrement étudiés les effets au niveau de la tête tels que : cancers (tumeurs cérébrales, de certains nerfs, de l'œil, de glandes), problèmes oculaires, auditifs, douleurs, et les risques pour la population jeune (Kheifets et Shimkhada, 2005). La littérature contient un nombre important de références épidémiologiques ou comportementales dont les résultats sont très variables étant donné que beaucoup de paramètres incontrôlés et de biais entrent en jeu (Ahlbom *et al.*, 2004).

Parmi les travaux basés sur des questionnaires, certains corréleront l'exposition aux CEM HF de faible amplitude à des sensations subjectives d'inconfort, des maux de tête (Wilen *et al.*, 2003). Les études comportementales et cognitives (effets des CEM sur la mémoire, la concentration, l'électroencéphalogramme) sont assez nombreuses malgré les problèmes d'éthiques qu'elles soulèvent. Elles sont basées sur l'exposition d'un petit nombre de volontaires et utilisent des téléphones portables comme outil de stimulation, sans réelle maîtrise du CEM (AFFSE², 2005), ce qui limite leurs conclusions.

Il apparaît que la plupart des travaux récents dans ces domaines montrent un risque potentiel (Kundi *et al.*, 2004) mais souffrent d'une mauvaise évaluation de l'exposition au CEM. De nombreux facteurs incontrôlés (type de matériel, durée d'exposition, environnement...) font que les conditions d'exposition au CEM des individus étudiés sont peu ou pas maîtrisées et amènent beaucoup d'incertitudes au niveau des résultats (Ahlbom *et al.*, 2004 ; Auvinen *et al.*, 2006). A ce propos, une publication souligne la tendance générale à surévaluer les risques liés à l'exposition électromagnétique et montre qu'il est rarement possible d'établir un lien direct entre les conséquences observées et l'exposition (Wood, 2006).

Cela concerne par exemple les polémiques concernant les études réalisées sur les cas de leucémies, cancers parmi les plus fréquents chez les enfants (Kheifets et Shimkhada, 2005) qui ont été corrélés à la proximité d'antennes relais (TV, GSM). Quatorze années de données épidémiologiques ont été synthétisées, montrant qu'il n'est finalement pas possible d'établir une corrélation entre exposition EM et cancer pour deux raisons (Elwood, 2003) : l'impossibilité de quantifier précisément le taux d'exposition EM des individus et le nombre important de facteurs qui peuvent intervenir au cours du processus physiologique (souvent long) de développement d'un cancer.

Dans les pays développés, la quasi-totalité de la population utilise les technologies de communication sans fil (ou est passivement soumise aux CEM HF). La poursuite des travaux dans ce domaine est importante compte tenu du risque encouru mais il est de plus en plus difficile de disposer de population exposée à aucun CEM HF (Kundi, 2004). En d'autres termes, les recherches ne disposent plus de populations « témoins » comparables.

Les études de cas sont des alternatives intéressantes et prometteuses car elles analysent les relations statistiques entre des cas avérés de cancers ou d'autres pathologies et l'utilisation des téléphones mobiles (Bamiou *et al.*, 2007). Ces études s'affranchissent à la fois du biais important que représente le temps et des questions liées à l'éthique. L'étude INTERPHONE, en cours de réalisation dans 13 pays depuis 2000 (Cardis *et al.*, 2007), apportera en 2008 de nouvelles données sur l'existence ou non d'une relation entre le développement de diverses tumeurs cérébrales et l'utilisation des téléphones portables. Les premiers résultats disponibles montrent une absence de corrélation (Hours *et al.*, 2007). En résumé, la dosimétrie et le recul actuels sont insuffisants pour que les études sanitaires puissent conclure à la nocivité des CEM HF de faible amplitude sur la population (AFSSE², 2005 ; Valberg *et al.*, 2007). Les travaux se poursuivent en privilégiant la quantification individuelle de l'exposition au CEM (Ahlbom *et al.*, 2004).

2.2. Données expérimentales

Les études expérimentales se placent pour la plupart sous les limites d'exposition EM proposées par les normes internationales, hors des effets thermiques démontrés, dus aux CEM de forte puissance. Leurs résultats sous-entendent l'existence d'un mécanisme d'interaction de type athermique avec le modèle biologique.

Les quelques travaux menés sur l'homme concernent pour la plupart la circulation sanguine (tension artérielle, thermorégulation...) et apportent des résultats négatifs (Tahvanainen *et al.*, 2004). Il faut noter cependant que les expérimentations sur l'homme sont limitées par des contraintes législatives et éthiques. Les études *in vivo* sont principalement conduites sur des muridés en reprenant les thèmes abordés sur l'homme : cancers divers (Sommer *et al.*, 2007), fonctions cognitives et comportementales (Nittby *et al.*, 2007). Elles présentent les mêmes limites que celles notées chez l'homme (mauvaise caractérisation du CEM et paramètre biologique complexe) ce qui diminue la pertinence de leurs conclusions, souvent négatives (AFSSE², 2005). Des résultats sont obtenus via l'étude de paramètres simples : l'une des publications majeures concerne l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-céphalique des rats sous un CEM de fréquence 915 MHz (Salford *et al.*, 1994). Cette thématique a été très étudiée ces dernières années mais les conclusions restent incertaines, toujours pour les mêmes raisons (Orendáčová *et al.*, 2007). Chez le rat, divers paramètres semblent être affectés par les CEM HF de faible amplitude, en particulier une baisse de la fertilité (Yan *et al.*, 2007), une modification du profil d'expression génique des neurones (Zhao *et al.*, 2007), ou un déclenchement des processus de stress oxydatif (Yurekli *et al.*, 2006). En parallèle, d'autres études soulignent l'absence d'effet sur l'expression des protéines HSP (Sanchez *et al.*, 2008), sur plusieurs paramètres de la microcirculation cérébrale (Masuda *et al.*, 2007) et sur la spermatogenèse (Dasdag *et al.*, 2008).

Ces modèles expérimentaux complexifient les protocoles (conditions non physiologiques, stress, problèmes de maîtrise du CEM) ce qui diminue la portée des travaux (D'Andrea *et al.*, 2003).

Les plus démonstratives sont les études menées sur les cultures cellulaires humaines et animales. Les protocoles utilisant des cellules présentent l'avantage de mesurer des paramètres précis sur des modèles vivants « simples » et variés qui sont faciles à isoler et à exposer au CEM. Le projet européen REFLEX (REFLEX, 2004) mené pendant 4 ans dans une douzaine de laboratoires (universités, instituts, hôpitaux...) montre sur diverses lignées cellulaires (humains, rats, souris) que les CEM HF sont des facteurs de stress cellulaire : effets génotoxiques, modifications d'expressions géniques, de profils protéiques, activation des processus oxydatifs... En revanche, des paramètres plus complexes comme la différenciation cellulaire, l'apoptose ou les fonctions immunitaires ne semblent pas être affectés par le champ. Plusieurs marqueurs apparaissent sensibles à l'action des CEM HF de faible amplitude : des kinases (dont certaines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire), des régulateurs de transcription ainsi que différents récepteurs (Cotgreave, 2005) ont leur activité modifiée par le CEM. Les travaux de grande envergure, utilisant des approches par microarray sur des lignées cellulaires humaines, montrent fréquemment des modifications de l'expression génique liées à des fonctions membranaires, des étapes du cycle cellulaire, le métabolisme et les réponses aux stress (REFLEX, 2004 ; Cotgreave, 2005).

Les modifications d'expression du génome en réponse au CEM HF sont souvent décrites et seraient aussi fonction du type cellulaire (Nylund et Leszczynski, 2006). D'autres études montrent une action des CEM HF sur la phosphorylation des protéines kinase et d'une manière générale sur le protéome (Leszczynski *et al.*, 2002). Ce sont d'ailleurs les protéines de la famille HSP (Heat Shock Protein) qui sont les plus fréquemment utilisées comme marqueurs de la réponse biologique au CEM HF depuis la fin des années 80, *in vitro* et *in vivo* (Cotgreave, 2005 ; Lixia *et al.*, 2006).

Ces marqueurs répondent à de très nombreux stimuli mais leur propriété première, découverte chez la drosophile en 1962 (Wirth *et al.*, 2003), est de protéger la conformation des protéines cellulaires en réponse à une hausse de température. Les HSP ont ainsi largement contribuées au développement de la notion d'effets « athermiques » car les rayonnements utilisés par la téléphonie mobile ne sont pas ionisants, ce qui rend impossible des effets directs et destructeurs sur des structures ou macromolécules biologiques (Ahlbom *et al.*, 2004), et de surcroît leur puissance est trop faible pour conduire à des modifications directes de température d'un tissu. Malgré le fait que leurs conclusions soient parfois contradictoires et que les conditions d'exposition EM ne soient pas toujours contrôlées, ce sont les résultats des études focalisées sur des modèles cellulaires qui soulèvent le plus de questions, notamment celle du mécanisme d'interaction.

2.3. Modulation des signaux GSM

Les téléphones mobiles GSM 900 utilisent une onde porteuse de fréquence 900 MHz modulée par un signal basse fréquence à 217 Hz. Parmi 22 études menées sur l'apparition de tumeurs chez des animaux, 3 montrent une corrélation entre l'augmentation du nombre de tumeurs et la modulation du signal EM, les autres concluent à l'absence de lien (Valberg *et al.*, 2007). Un article de synthèse dédié aux effets de la modulation insiste sur le fait qu'aucun des travaux ne permet d'établir un lien significatif entre ces modulations et des effets biologiques (Foster et Repacholi, 2004). Les auteurs proposent de maîtriser en priorité les paramètres liés à l'émission du CEM, avant même de travailler sur les modulations. Le problème principal étant l'inexistence même de mécanismes capables d'expliquer une telle interaction. Il apparaît conceptuellement difficile qu'une structure biologique puisse interpréter les modulations complexes des fréquences GSM (Valberg *et al.*, 2007). Cela n'a d'ailleurs jamais été décrit.

2.4. Matériel expérimental

De nombreux travaux utilisent directement le téléphone portable comme source d'émission du champ et sans maîtrise de l'environnement EM. C'est par exemple ce qui pose problème pour l'ensemble des études épidémiologiques faites jusqu'à maintenant, dans la mesure où il est impossible de déterminer dans quelle proportion la population étudiée a été exposée (Ahlbom *et al.*, 2004). Evidemment, les téléphones mobiles ne sont pas, en l'état, des outils fiables pour des approches scientifiques. Leurs émissions doivent être maîtrisées et caractérisées, l'idéal étant de les reproduire en conditions contrôlées.

Des antennes isolées sont parfois utilisées comme alternative et permettent de maîtriser l'émission du CEM (Figure 1), c'est le cas des « gunn oscillators » qui sont une forme d'antenne cornet (Tafforeau *et al.*, 2004). Cependant, beaucoup des travaux qui utilisent une source EM améliorée se déroulent encore dans un environnement ouvert, soumis aux variations EM parasites.

L'outil le plus abouti utilisé dans la littérature est la cellule TEM (Transverse ElectroMagnetic, Figure 1), notamment pour les études faites sur les cultures cellulaires et les petits animaux (Marinelli *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2007 ; Tkalec *et al.*, 2007). Les principales contraintes de cet outil sont sa taille réduite ainsi que la direction particulière du CEM émis à l'intérieur (polarisation et angle d'incidence fixes). Cependant, la cellule TEM permet de maîtriser le CEM et de protéger les expériences des variations EM extérieures.

Pour des volumes plus grands, certains travaux utilisent des chambres anéchoïques (Figure 1) : ce sont des cavités qui protègent aussi les expérimentations mais dont les parois absorbent les rayonnements EM (Stankiewicz *et al.*, 2006). Elles sont particulièrement utiles pour tester une orientation particulière du CEM.

En résumé, il est difficile de trouver dans la littérature des travaux qui maîtrisent sans contraintes l'environnement expérimental, l'émission du CEM et le volume de test.

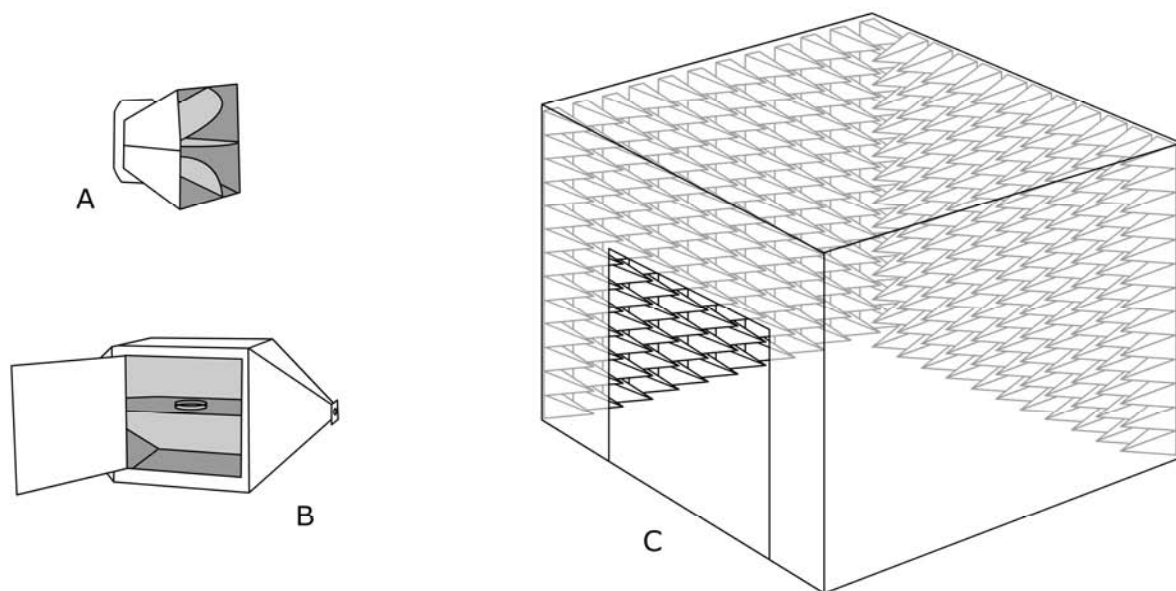


Figure 1 : *matériels utilisés pour l'expérimentation EM. A, antenne corne ; B, cellule TEM ; C, chambre anéchoïque.*

3. Les champs électromagnétiques

3.1. Définitions

C'est un mouvement alternatif de charges électriques (courants variables dans le temps) qui constitue le plus souvent la source d'un champ électromagnétique caractérisé par un champ électrique E et un champ magnétique H . La structure la plus simple pour représenter une onde électromagnétique est une onde plane (Figure 2) monochromatique, de pulsation $\omega = 2\pi / T = 2\pi\nu / \lambda$ où T est la période de l'onde, λ la longueur d'onde et ν sa vitesse de propagation (égale à la vitesse de la lumière c dans le vide). Une onde plane est telle que les vecteurs E , H et la direction de propagation forment un trièdre direct, les champs E et H étant en phase, et le rapport de leur amplitude étant constant. Lorsqu'un objet situé dans un espace libre est soumis à une onde électromagnétique polarisée linéairement, le vecteur champ électrique est situé dans un plan fixe, perpendiculairement à la direction de propagation.

Si ce même objet se trouve immergé dans une cavité intégrant une source EM de longueur d'onde faible devant les dimensions de la structure, le CEM est alors homogène (d'amplitude identique en tout point) et isotrope (les trois composantes des vecteurs champ ont la même amplitude). Pour ce travail nous avons utilisé un CEM possédant ces deux propriétés (Figure 3).

Selon l'approche choisie, le CEM peut être considéré comme une perturbation locale des champs électriques et magnétiques ou comme un déplacement de photons (particules de masse nulle) dont l'énergie dépend de la fréquence du rayonnement. Par conséquent, la nature des CEM est très variable : ondes radio, lumière visible, rayons cosmiques, etc., et couvre un large spectre de fréquences (Figure 4) qui s'étend des ondes radio (longueur d'onde de plusieurs kilomètres) aux rayonnements Gamma (γ , longueur d'onde de l'ordre du picomètre et moins) en passant par le spectre étroit de la lumière visible ($\lambda = 400 - 700 \text{ nm}$).

Par exemple, un photon issu d'un rayonnement ultra violet est plus énergétique qu'un photon de lumière visible (longueur d'onde plus grande) et les rayonnements ionisants (x et γ), qui possèdent des longueurs d'ondes inférieures au nanomètre, sont composés de photons d'énergie suffisamment importante pour rompre directement des liaisons moléculaires. Les êtres vivants sont continuellement soumis à une grande variété de CEM et ils en émettent eux-mêmes à travers leurs activités métaboliques, leurs communications cellulaires, etc. Le CEM se quantifie de 2 manières, soit par densité de puissance (W.m^{-2}) soit par intensité du champ électrique (V.m^{-1}).

La fréquence utilisée au cours de ce travail (900 MHz) est située dans la gamme des « Ultra Hautes Fréquences, UHF » (Figure 4) s'étendant de 300 MHz à 3 GHz (longueur d'onde comprise entre 1 m et 10 cm) et incluant les « micro-ondes » (900 MHz - 300 GHz). Par souci de simplification, nous utilisons pour ce travail la notation « HF » (Haute Fréquence, 300 KHz - 300GHz) pour désigner la source de CEM considérée dans cette étude.

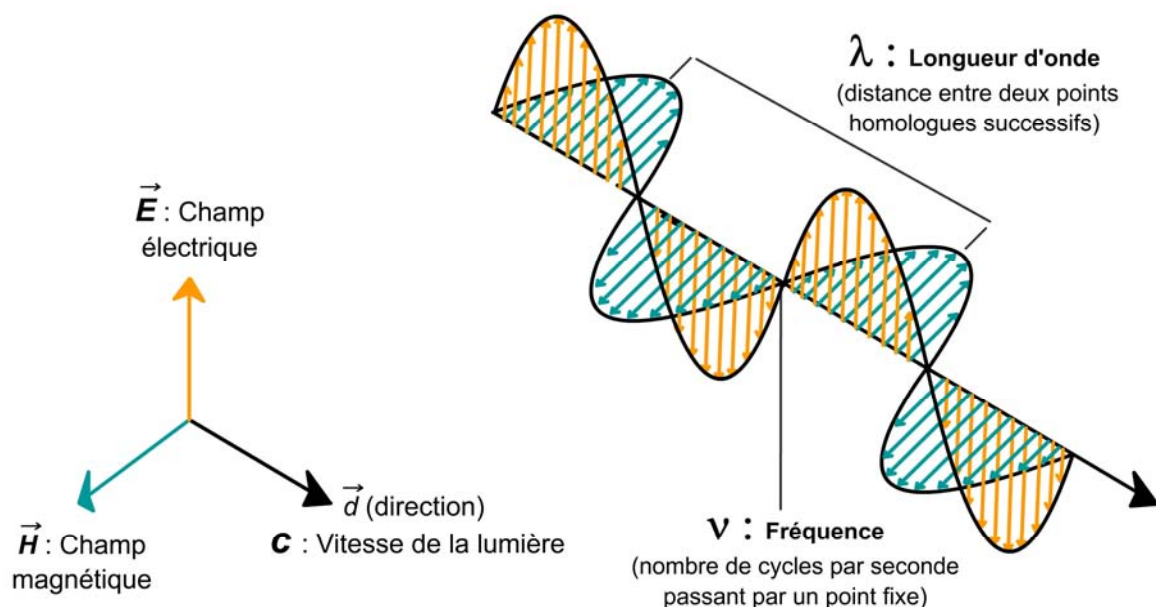


Figure 2 : représentation d'une onde électromagnétique.

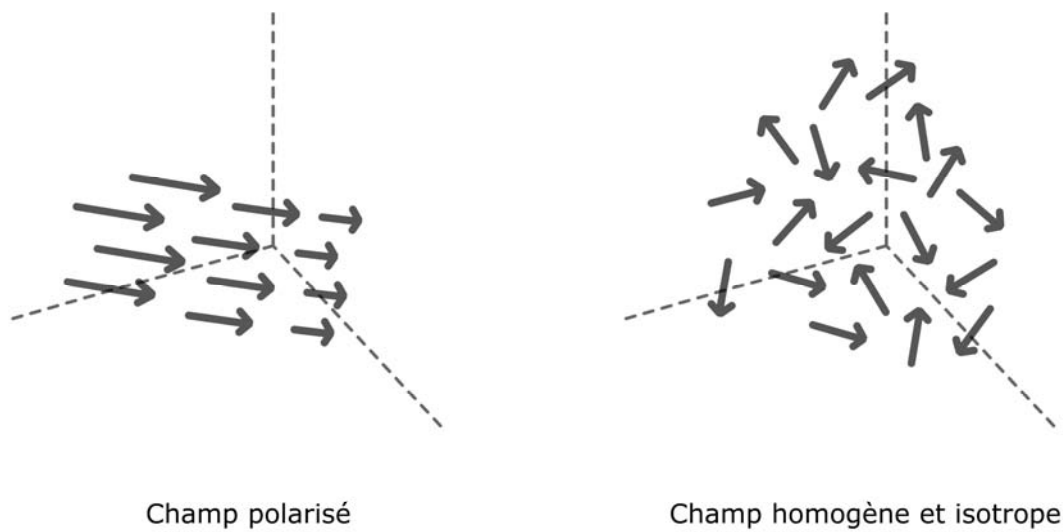


Figure 3 : illustration des propriétés d'un champ électromagnétique.

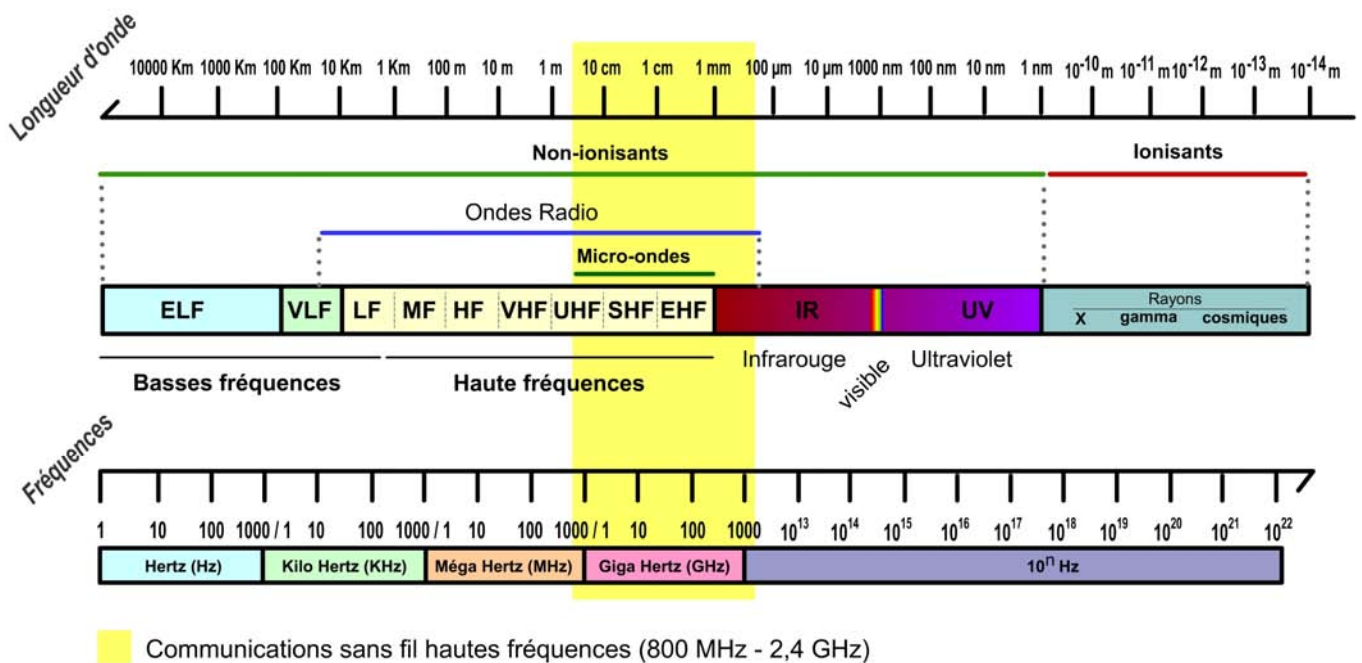


Figure 4 : spectre des rayonnements électromagnétiques. E, extremely ; F, frequency ; H, high ; L, low ; M, medium ; S, super ; U, ultra ; V, very.

3.2. Grandeurs et Unités

Historiquement, les phénomènes thermiques liés aux CEM sont les seuls mécanismes bien caractérisés conduisant à des effets biologiques. Le débit d'absorption spécifique (DAS) est une grandeur extrêmement répandue depuis la publication des limites d'exposition par l'ICNIRP et permet d'évaluer de manière théorique l'énergie absorbée et transformée en chaleur par un tissu vivant. Cette approche dosimétrique sous-entend implicitement l'existence d'une relation linéaire entre l'absorption d'énergie par le modèle et la réponse biologique associée. Cette grandeur a été retenue par le dernier décret français (2002-775) qui l'utilise pour exprimer les limites d'exposition au CEM. Le DAS n'est pas directement mesurable, mais estime la puissance d'énergie absorbée par unité de masse de matière biologique en W.Kg^{-1} . Il est influencé par plusieurs paramètres (ICNIRP, 1998) tels que les caractéristiques intrinsèques au CEM (fréquence, intensité, polarisation, distance à la source), celles propres au modèle (taille, géométrie, structure externe et interne des tissus, constantes diélectriques) et l'influence de l'environnement sur le CEM (diffraction, réflexions).

De nombreux modèles (appelés fantômes) ont été développés afin de « mimer » par exemple la structure d'une tête humaine, ou le corps des rats et de pouvoir ainsi affiner les protocoles de mesure du DAS (CENELEC, 2001). Cette grandeur s'évalue facilement pour les champs lointains (typiquement les CEM produits par les stations de base), mais requiert des techniques complexes de modélisation pour les champs proches (Ministère de la Santé, 2001), notamment pour les études liées à l'utilisation des téléphones portables.

Notre travail se positionne préférentiellement en terme de mesure d'effets physiologiques plutôt qu'en approche dosimétrique. Pour exprimer le CEM HF, nous utilisons les grandeurs originellement reconnues (ICNIRP, 1998) à savoir l'intensité du champ électrique en V.m^{-1} (qui peut se traduire en densité de puissance en W.m^{-2}) et la fréquence en Hz.

3.3. Cas particulier de la téléphonie mobile

En Europe, la téléphonie mobile fonctionne principalement via le réseau de deuxième génération GSM (Global System for Mobile communications) qui utilise deux fréquences distinctes : 900 MHz et 1800 MHz. Ce réseau est découpé en cellules de couverture dont la taille varie selon la situation du relais central (contexte urbain ou rural). Le réseau GSM 900, actuellement le plus répandu utilise une bande spectrale de 872 à 960 MHz. Pour se satisfaire de cette bande étroite, les communications sont transmises par une modulation complexe selon trois méthodes : codage, découpage dans le temps et modulation de fréquences (Jaton et Roubaty, 2002). En résumé, cela permet de multiplexer simultanément 8 communications (Ministère de la Santé, 2001). La modulation du signal EM n'ayant pas été corrélée à des effets biologiques (AFFSE, 2005), le CEM étudié au cours de ce travail correspond au champ principal (fréquence et amplitude) sans découpage ni modulation.

4. La notion de stress chez les plantes

4.1. Sensibilité des plantes à leur environnement

L'immobilité des végétaux contraint au développement d'une sensibilité accrue aux variations environnementales : l'une des stratégies de survie mise en place par les plantes consiste à percevoir et analyser très rapidement les signaux environnementaux, pouvant être relativement faibles, de manière à optimiser leur croissance et leur développement. Au niveau cellulaire, la transduction de ces signaux va conduire selon le contexte à des réponses moléculaires qui peuvent être transmises au sein de la plante entière et entre plantes pour finalement conduire à des modifications physiologiques.

La biologie végétale a montré que les plantes sont capables de répondre à la plupart des stimuli biotiques et abiotiques tels que : le vent, la température, la disponibilité en eau et en nutriments, les attaques de pathogènes, d'insectes, d'herbivores, les variations lumineuses, la gravité, les concentrations en différents gaz et hormones... (Ferguson 2004). En 1959, par exemple, une étude montre que de jeunes plants de tomates modifient leur physiologie (en terme de croissance et d'accumulation d'ARN) en réponse à de courtes périodes de privation d'eau (Gates et Bonner, 1959). Le ralentissement de la croissance est le paramètre qui traduit le plus souvent un stress végétal quel qu'il soit.

Il est aussi possible de rencontrer des mécanismes complexes : certaines plantes sont capables pour se défendre vis-à-vis d'un insecte herbivore, d'attirer son prédateur par l'excrétion de molécules volatiles très spécifiques (Alborn *et al.*, 1997) aussitôt qu'elles perçoivent une attaque de leurs tissus. D'autres possèdent des structures mobiles pour se nourrir ou propager leur pollen (Braam, 2005).

La réponse des cellules vivantes à une variation environnementale peut se décomposer ainsi : **perception -> transduction (-> transmission) -> réponse**. Les cellules végétales ne font pas exception et possèdent à chaque niveau des mécanismes propres et régulés (Trewavas, 2000) qui permettent à la plante de répondre différemment selon le stimulus, son antécédent ou la période donnée (jour/nuit, saison).

Les systèmes cellulaires de défense internes et externes que possèdent les plantes sont en de nombreux points semblables à ceux développés par les animaux, notamment au niveau des mécanismes d'initiation de la réponse cellulaire (phospholipase C) ainsi que pour l'homéostasie du calcium (Shiina *et al.*, 1997 ; Nagata *et al.*, 2004 ; Piacentini *et al.*, 2004). De plus, les végétaux utilisent la communication intercellulaires (sous forme de signaux électriques et/ou moléculaires) et externes (par l'excrétion de molécules à fonction hormonale) de manière à prévenir les parties éloignées d'une même plante ou d'une plante voisine de la perception d'un stimulus (Bowles, 1998). Ce phénomène est celui qui caractérise le mieux la réponse des plantes à un stress environnemental. Il met en jeu des mécanismes « systémiques » à plus ou moins long terme que nous ne développerons pas ici, ce travail s'étant focalisé sur les réponses moléculaires locales.

Chaque cellule végétale conserve toutes les capacités nécessaires pour initier une réponse de défense à tel ou tel stimulus. Ces réponses passent par la modification très fine de l'expression de gènes spécifiques (Reymond *et al.*, 2000 ; Coker *et al.*, 2005). Les protéines résultantes interviennent alors dans des mécanismes tels que le maintien de l'intégrité cellulaire, l'inhibition de l'éventuel prédateur, la régulation de métabolismes particuliers, etc. (León *et al.*, 2001).

La notion du temps est très importante dans ces phénomènes de perception puisque les premières réponses moléculaires locales peuvent être détectées dans les minutes, voire les secondes (Davies, 2006, communications personnelles) qui suivent un stimulus alors que plusieurs heures ou jours peuvent s'écouler avant l'apparition « visible » d'une modification physiologique ou morphologique (León *et al.*, 2001).

4.2. Mécanismes

La réponse cellulaire prend naissance au niveau de la membrane. Un stimulus donné va activer un récepteur particulier (protéine transmembranaire, canal ionique...) qui va conduire à la production de messagers secondaires. Ces derniers, selon le contexte vont alors moduler des voies de signalisation pour finalement conduire à des modifications biochimiques, puis métaboliques et plus tard physiologiques : il y a transduction du stimulus en réponse biologique. Il faut se représenter la cellule végétale comme un réseau très complexe de voies de signalisations, matérialisées par une grande quantité de molécules organiques et protéines qui possèdent plusieurs états d'activation. Selon l'événement externe qui est perçu, il s'ensuit une réaction en chaîne intracellulaire qui peut se propager jusqu'au noyau pour modifier l'expression du génome. De nombreux flous existent sur les détails de ces mécanismes mais il est possible de décomposer l'ensemble en plusieurs étapes :

Primo événement

Il est tout d'abord nécessaire qu'un événement primordial intervienne pour conduire à une micro entrée, très localisée, de calcium dans le cytoplasme (Knight *et al.*, 1993 ; Medvedev, 2005).

La membrane plasmique possède des canaux à calcium sensibles aux variations de potentiel (voltage-dependent Ca^{2+} channels) dont l'existence a été démontrée par « patch-clamp » (technique d'étude des membranes cellulaires à l'aide de micropipettes capillaires) il y a une quinzaine d'années chez les plantes supérieures (Thuleau *et al.*, 1994). Ces canaux interviennent par exemple lors des phénomènes de dépolarisation de membrane plasmique en cas de dommage mécanique des cellules, typiquement après production d'oligosaccharides (produits de dégradation des parois cellulaires) lors d'une attaque par un herbivore (Thain *et al.*, 1995), ou lors de brûlures (Vian *et al.*, 1999). Des signaux électriques peuvent aussi provenir d'un tissu éloigné signalant une agression, au sein de la même plante (Davies, 2006).

Les techniques de patch-clamp ont également permis de découvrir l'existence de canaux sensibles à la pression (stretch channels) sur les membranes plasmiques et vacuolaires. Ils font office de récepteurs à certaines tensions, pressions osmotiques etc. et y répondent en laissant circuler localement différents types d'ions au travers des membranes (Alexandre et Lassalles, 1991 ; Cosgrove et Hedrich, 1991 ; Telewski 2006).

L'entrée de calcium peut être également déclenchée par un type particulier de messenger secondaire qui va circuler et être capté par des canaux ioniques sensibles. Dans la plupart des cas, les messagers secondaires (inositol-triphosphate IP_3 , diacylglycerol DAG, acide phosphatidique...) sont issus de la dégradation des lipides membranaires (Wang *et al.*, 2002) par diverses phospholipases (PLA, B, C et D). À titre d'exemple (Figure 5), certains canaux ioniques des membranes (en particulier vacuolaires) sont activés par la présence d' IP_3 (Alexandre *et al.*, 1990 ; Trewavas, 2000).

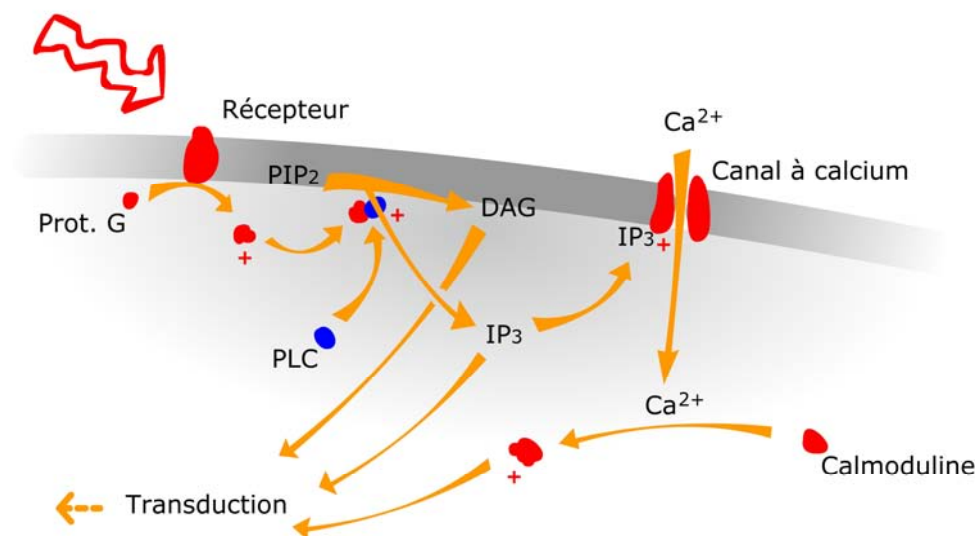


Figure 5 : rôle des messagers secondaires lipidiques dans l'initiation de la réponse cellulaire. La perception d'un stimulus par un récepteur membranaire peut conduire à l'activation, en cascade, de plusieurs protéines cytoplasmiques dont des phospholipase et produire, par lyse des lipides membranaire, des messagers secondaires (DAG, IP_3). Ces derniers peuvent alors jouer de nombreux rôles dans le cytoplasme, notamment dans la régulation des canaux calciques et dans la propagation de la cascade de transduction.

Cette molécule, tout comme le DAG, sont des messagers secondaires importants plus ou moins diffusibles (Perera *et al.*, 2006) produits par l'action de la phospholipase C (PLC) sur les lipides membranaires (phosphatidyl-inositol-diphosphate ; PIP₂). Comme beaucoup d'enzymes, la PLC est activée par des protéines G (GTPases), elles-mêmes activées par des récepteurs extrêmement variés, la plupart étant des protéines transmembranaires (Trewavas, 2000). Ces récepteurs peuvent être sensibles à des hormones, des molécules chimiques, des variations de potentiel, des tensions mécaniques... L'activité de plusieurs phospholipases (dont des PLC) est également modulée par la présence de calcium ce qui illustre la complexité des interactions moléculaires au sein de la cellule.

En plus du cytosquelette, que les molécules d'intégrine impliquent dans la transduction cellulaire, plusieurs mécanismes de réponse interagissent en faisant intervenir d'autres messagers secondaires (Trewavas 2000 ; Piacentini *et al.*, 2004) : les espèces oxygénées réactives, l'ADP-ribose cyclique (des canaux calciques sont sensibles à l'ADPRc), l'AMPcyclique, les protéines kinases libres et membranaires (PK), les MAPkinases, les protéines HSP, etc., chacun étant acteur d'une voie particulière qui intervient selon le contexte : métabolisme, développement, hormones, défense.

Le pH cellulaire joue également un rôle important, dans la régulation fine des canaux ioniques membranaires (Colcombet *et al.*, 2005) et des réactions métaboliques. Il varie notamment selon les flux de protons associés aux variations d'ATP (action des ATPases) et aux mouvements ioniques (antiport / symport H⁺).

Parallèlement, une notion assez récente chez les plantes, et de plus en plus étudiée, concerne l'ATPe (ATP extracellulaire). L'ATP qui est présent dans le cytoplasme comme réserve énergétique (quelques mM) serait aussi libéré par les cellules dans l'apoplasme pour servir de messager du stress. Des travaux montrent en effet que l'ATPe est capable de déclencher une entrée de calcium dans le cytoplasme. Cependant, les mécanismes de sortie et de perception de l'ATP sont encore à découvrir, aucun récepteur n'ayant été cloné chez les plantes (Jeter et Roux, 2006 ; Roux et Steinebrunner, 2007).

Libération de calcium

C'est souvent une augmentation massive de la concentration en calcium cytoplasmique qui caractérise la mise en place d'une réponse cellulaire (Figure 6). L'ion calcium étant relativement peu mobile dans le cytoplasme, c'est via un mécanisme de propagation que l'entrée initiale de calcium est amplifiée (Trewavas, 1999). Ce sont les canaux membranaires qui interviennent dans la mise en place de ce que certains auteurs appellent une « onde calcique ».

Il existe un ensemble de pompes et de canaux ($\text{Ca}^{2+}/\text{ATPases}$, $\text{H}^{+}/\text{ATPases}$, antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$) sur les différentes membranes qui permettent de maintenir (en plus du pH) un gradient de concentration en calcium très fort entre le cytoplasme et l'ensemble organites/espace extracellulaire (Harper, 2001). La cellule végétale peut alors être considérée comme un groupe de réservoirs à calcium (vacuole, organites, espace extracellulaire) susceptibles de pouvoir se déverser rapidement dans le cytoplasme, espace très pauvre en calcium (Figure 6). Alors que les mitochondries et le réticulum contiennent en moyenne ± 1 mM de calcium (Clarkson *et al.*, 1988 ; Medvedev, 2005), les concentrations de la paroi cellulaire et de la vacuole varient entre 1 et 10 mM (Trewavas, 2000 ; Medvedev, 2005) ce qui est conséquent au regard de la concentration cytoplasmique ($\pm 0,0001$ mM) à l'état de repos.

Transduction

Tous les événements membranaires conduisent à des influx massifs de calcium dans le cytoplasme. Dès qu'un primo événement intervient, un choix commence à se faire sur le type de voie de transduction induite en fonction de l'amplitude, de la durée et de la localisation de la première entrée de calcium (Knight *et al.*, 1993, Trewavas, 1999). Certains auteurs évoquent la « topologie » du gradient de calcium ou le motif « spatio-temporel » comme événement déterminant. Le mécanisme sous-jacent, qui reste mal connu, résiderait dans la grande diversité des macromolécules qui pré-existent dans le cytoplasme. Chez *Arabidopsis thaliana*, 2 % du génome codent pour des protéines affines du calcium (Medvedev, 2005).

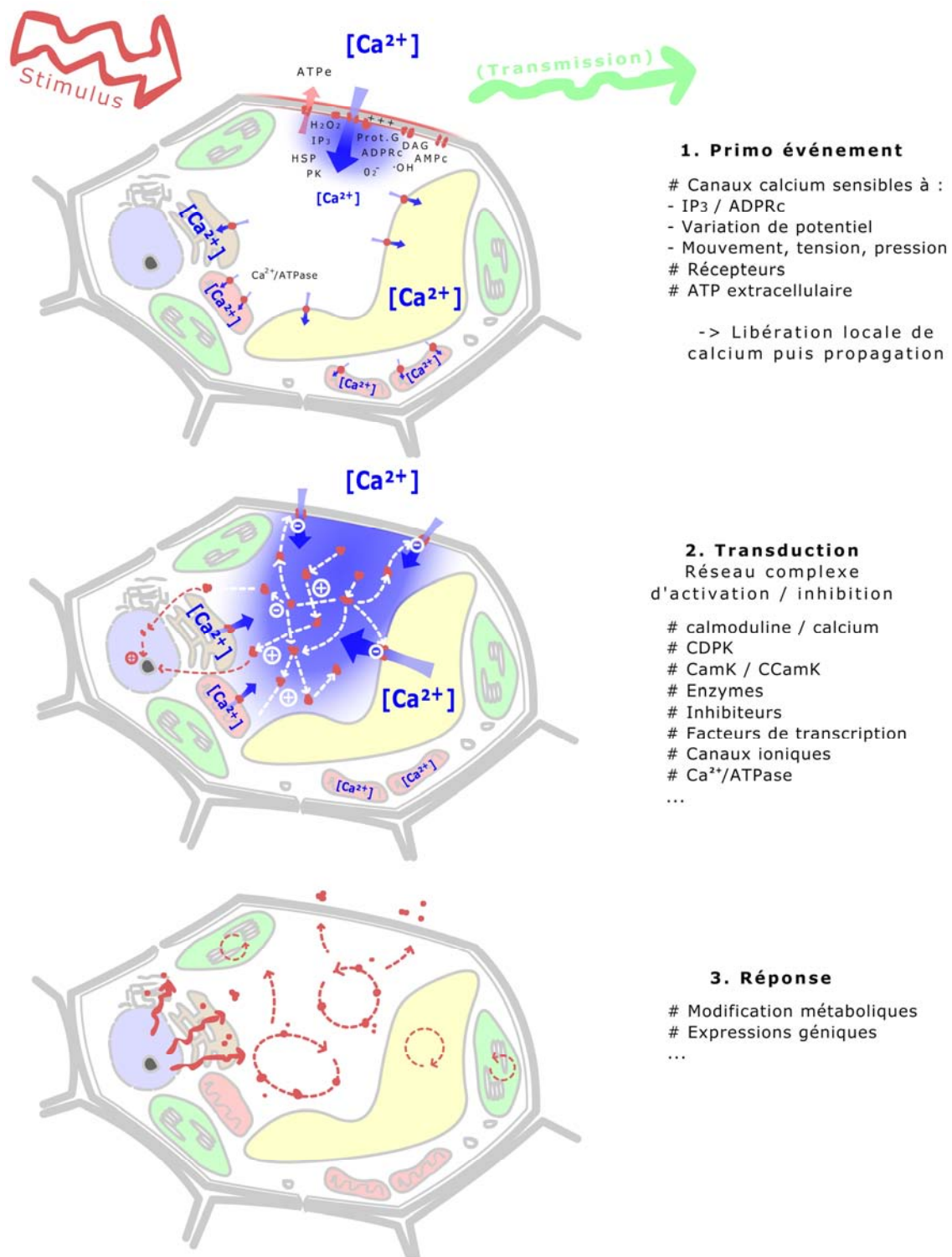


Figure 6 : étapes de réponse d'une cellule végétale à un stimulus. La réponse d'une cellule à un stimulus peut être découpée en trois étapes : le primo événement (perception même du stimulus par la membrane et premiers flux de calcium), la transduction (activation des voies de transduction en fonction de la localisation et de l'importance des flux de calcium) et la réponse (régulations diverses du métabolisme et de l'activité nucléaire).

Le calcium va alors intervenir directement ou indirectement dans la régulation de l'activité de très nombreuses protéines (Leitner-Dagan et Weiss, 1999 ; Sathyanarayanan et Poovaiah, 2004) : sa fixation sur des protéines affines du calcium (Calmoduline, CDPK, CamK, CCamK) va modifier d'autres kinases ou phosphatases placées en aval de la chaîne de transduction, en les activant, en modifiant leur localisation cellulaire ou leur spécificité au substrat (Harmon 2003 ; Leclercq *et al.*, 2005). Au bout de la chaîne se trouvent, selon le contexte et le stimulus de départ, des enzymes clefs de certaines voies métaboliques, des facteurs de transcription, des acteurs de défense cellulaire... (Kuo *et al.*, 1996 ; Hopkins, 1998). Les plantes ont spécialement développé une importante collection de CDPK (protéines kinases dépendantes du calcium), environ 34 gènes chez *Arabidopsis thaliana* (Cheng *et al.*, 2002 ; Nagata *et al.*, 2004) qui sont de véritables capteurs à calcium (Ludwig *et al.*, 2004) regroupés en sous-ensembles selon leurs rôles cellulaires (Harper *et al.*, 2004 ; Ray *et al.*, 2007). La fixation de l'ion Ca^{2+} sur une CDPK modifie sa conformation, sa localisation cellulaire et/ou son affinité pour un substrat (les CDPK possèdent une région auto inhibitrice qui se déplace lorsqu'elle fixe le calcium, libérant alors leur site enzymatique, Leclercq *et al.*, 2005). Il en est de même pour le marqueur *lecdpk1* qui code pour une protéine kinase dépendante du calcium s'accumulant localement et de manière systémique en réponse à une blessure chez la tomate (Chico *et al.*, 2002). Les CCamK et le CamK (protéines kinases dépendantes du calcium et/ou de la calmoduline) possèdent des propriétés très semblables mais c'est alors le complexe que va former le calcium avec la calmoduline qui va intervenir de préférence dans la régulation de leur activité (Harmon *et al.*, 2000). La calmoduline est une protéine ubiquiste du monde vivant, l'accumulation de son ARNm est typique d'une réponse végétale à une blessure et notamment chez la tomate (Depège *et al.*, 1997 ; Bergey et Ryan, 1999). N'ayant pas d'activité enzymatique propre, sa conformation change lorsqu'elle fixe le calcium (4 sites de fixation), elle se lie alors à de multiples cibles (Snedden et Fromm 1998) : enzymes (métabolisme oxydatif, lipidique, hormonal), facteurs de transcription, protéines du cytosquelette, pompe Ca^{2+} /ATPases, kinase... ce qui a pour conséquence de moduler leur activité (Zielinski, 1998).

Les différentes isoformes de la calmoduline que l'on trouve chez les plantes, tout comme les différentes CDPK, interviennent spécifiquement dans une voie donnée de signalisation selon le processus induit par le stimulus (Medvedev, 2005 ; Ray *et al.*, 2007) : c'est ce qui forme le réseau complexe de transduction. L'ensemble est rétro-contrôlé par certaines des cibles visées : phosphatases, inhibiteurs et notamment par des pompes à calcium (Ca^{2+} /ATPases) régulées par les CDPK elles-mêmes et par le complexe calcium calmoduline (Harper, 2001). Ces divers mécanismes font rapidement disparaître le gradient de calcium et chacun des acteurs reprend alors sa configuration de repos.

Enfin, lorsqu'un stimulus intervient, celui-ci est transmis localement (aux cellules les plus proches) mais aussi à distance de manière systémique (à travers l'ensemble de la plante). Le calcium est considéré comme le médiateur final lorsqu'il y a une transmission local ou systémique du stress (Castillo *et al.*, 2004) que ce soit via une communication hormonale (Dammann *et al.*, 1997), électrique ou hydraulique (Davies, 2006).

Réponse cellulaire

La réponse cellulaire, qui intervient dans les secondes voire les minutes qui suivent le stimulus prend au final plusieurs formes : régulation/activation de métabolismes, production de molécules pour réparer et/ou défendre, régulation de l'expression génique... Il s'en suit à plus long terme (quelques heures à plusieurs jours) des modifications physiologiques puis éventuellement morphologiques.

4.3. Les plantes et les CEM

Les plantes sont des récepteurs naturels des CEM HF dans la mesure où elles possèdent des structures dédiées à l'absorption des rayons lumineux (antennes collectrices pour la photosynthèse). Quelques travaux se sont intéressés à étudier l'impact des CEM HF sur le monde végétal. Cette démarche est justifiée puisque les plantes sont très sensibles aux champs magnétiques, notamment le champ terrestre ainsi que les CEM de très basse fréquence (ELF) qui influencent leur développement (Gallan et Pazur, 2005). Ainsi, des auteurs ont montré que des CEM HF (27 MHz) peuvent modifier le rythme de mouvement des feuilles du *D. gyrans*, la plante télégraphe (Ellingsrud et Johnsson, 1993). Une étude a souligné que la physiologie de pins (production de résine et sénescence des aiguilles) pouvait être influencée par les CEM HF émis par une antenne radio placée à proximité (Selga et Selga, 1996). Une autre étude de la même époque conclut peu d'effets sur de jeunes sapins et hêtres exposés à une fréquence de 2450 GHz émise par un magnétron (Schmutz *et al.*, 1996). Plus récemment, des travaux montrent que des plants de lin expriment une réponse typique de stress (production de méristèmes hypocotylaires) après exposition au CEM émis par un téléphone portable (Tafforeau *et al.*, 2002). Une autre publication fait état d'une baisse du taux de chlorophylle chez le robinier, qui serait fonction du temps d'exposition à un CEM HF de fréquence 400 MHz (Sandu *et al.*, 2005). Des lentilles d'eau exposées dans une cellule TEM à divers CEM (400 à 900 MHz) montrent un stress oxydatif (Tkalec *et al.*, 2007). Bien qu'elles ne maîtrisent pas toutes les conditions d'exposition EM, ces quelques références s'accordent sur le fait que les plantes sont influencées par les CEM HF et elles illustrent tout l'intérêt que les végétaux représentent pour l'étude de l'influence des champs sur le vivant. Il est possible de mesurer chez ces organismes immobiles des paramètres cellulaires universels, dans des conditions contrôlées. Cependant, les variables décrites dans la littérature sont encore peu nombreuses et trop souvent mesurées à long terme.

5. Approche expérimentale

Il est possible de classer les travaux autour des CEM HF en deux grands groupes (Tillmann et Buschmann, 2003) : d'un côté les études testant un ou quelques paramètres simples. C'est de ces travaux que ressortent les résultats les plus démonstratifs (montrant soit un effet avéré soit l'absence d'effet) mais qui ne peuvent souvent peu ou pas être extrapolés à la population humaine. Et de l'autre les études s'intéressant à des effets plus complexes, basées sur des échantillons de population, dont les résultats montrent une relation dose / effet et souffrent de nombreux biais et incertitudes. La bibliographie sur le CEM montre notamment que les études faites sur des animaux évolués souffrent de biais apportés par les conditions de leur maintien, et pour le cas des études faites sur les hommes, ce sont des variables subjectives qui interviennent.

L'utilisation d'une plante comme modèle d'étude est légitime de par le fait qu'elle représente un organisme vivant entier (et non une partie) dont nous pouvons maîtriser l'ensemble des conditions nécessaires à son développement de manière à ce que la seule variable résiduelle soit le stimulus EM que nous lui administrons. Le choix de la tomate est d'autant plus intéressant que c'est un modèle historiquement étudié pour les mécanismes de stress végétaux (Gates, 1955 ; Ryan, 1968 ; Bowles, 1998). Nous avons dans un premier temps mesuré les abondances de transcrits en réponse au CEM HF pour évaluer la réponse cellulaire. Puis, dans le but d'obtenir des informations sur le devenir de ces transcrits, nous avons mesuré leur prise en charge par les ribosomes, toujours en réponse au CEM. Le calcium étant typiquement impliqué dans la réponse cellulaire au stress, nous avons poursuivi les mesures des abondances des transcrits tout en modifiant la concentration en calcium du milieu (en modifiant celui-ci et par l'ajout de composés chimiques). Enfin, nous avons choisi d'évaluer l'état énergétique cellulaire : tout écart de la concentration en ATP et de la charge énergétique adénylique traduit directement une modification de l'activité métabolique. C'est un moyen simple et précis de mettre en valeur une influence du CEM HF sur notre modèle.

MATERIEL ET METHODES ::

1. Plan expérimental

La Figure 7 présente un schéma simplifié du plan expérimental permettant de préciser la chronologie selon laquelle les travaux se sont déroulés. En résumé, nous avons exposé des lots de plants de tomate à des rayonnements électromagnétiques haute fréquence au sein d'une chambre réverbérante à brassage de mode (CRBM) en conditions contrôlées et répétables. Pour chaque essai (modification du CEM, modification du milieu de culture, témoins), les échantillons prélevés à des temps déterminés ont été immédiatement congelés à l'azote liquide puis stockés (- 80°C) jusqu'à utilisation au travers des différents protocoles.

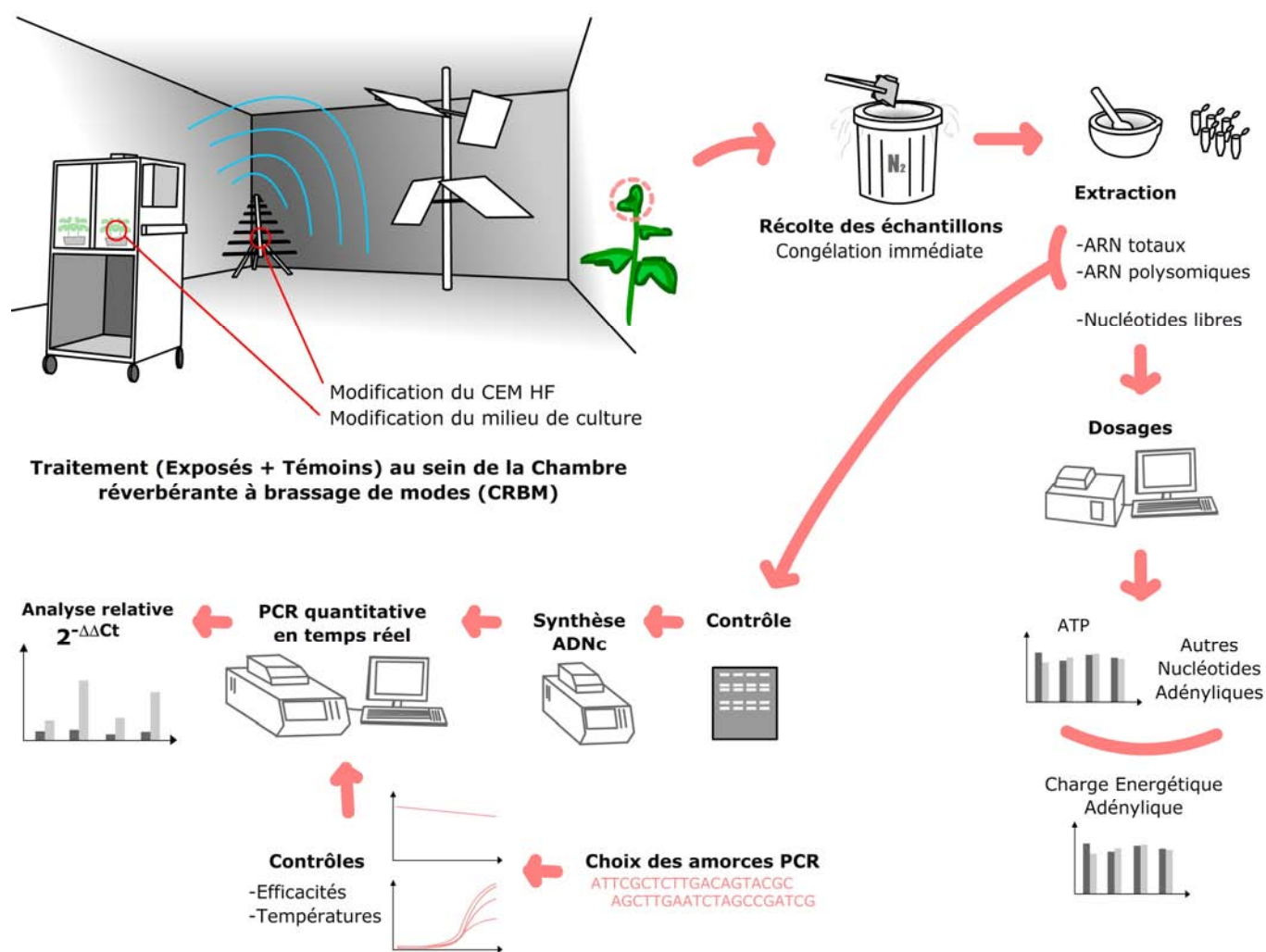


Figure 7 : synoptique expérimental.

2. Matériel Végétal

2.1. Conditions de culture

Pour cette étude, nous avons travaillé sur de jeunes plants de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv VFN-8, Solanacées) cultivés dans les conditions suivantes (Annexe 1) :

- germination des graines en serre sur vermiculite pendant 10 jours,
- transfert des plantules au laboratoire de physique dans un caisson de culture, sur un milieu standard hydroponique (Figure 8) jusqu'au stade 4^{ème} feuille émergente soit pendant trois semaines environ. A ce stade les plantes mesurent entre 15 et 20 cm de haut pour une dizaine de centimètres de large.

Deux caissons de culture ventilés (Figure 9) ont été spécialement construits pour ces travaux par notre atelier technique. Chacun propose exactement les mêmes conditions d'éclairement : une photopériode de 16 h – 8 h (avec une intensité lumineuse de $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ au bas du caisson à $175 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ au niveau de la feuille terminale) alternant 25°C le jour et 21°C la nuit. Dans chaque caisson, l'espace disponible (environ 40 x 60 cm) permet de recevoir 8 bacs de 900 ml, soit 48 plants de tomates en culture hydroponique. En coordination avec l'équipe de physique et l'atelier, la structure des caissons de culture a été pensée de manière à influencer au minimum le champ électromagnétique (CEM) utilisé dans les expériences : construction en bois en minimisant les pièces métalliques et en les éloignant le plus possible de la surface de culture. Les caractéristiques d'homogénéité et d'isotropie du champ électromagnétique (cf. § 3.2) ne sont pas affectées par ces chambres de culture ; seule l'amplitude du champ est atténuée par les parois (environ 20 %). L'un des deux caissons est « blindé », c'est-à-dire équipé sur ses parois internes d'un matériau aluminé multicouche le rendant opaque au CEM à la fréquence utilisée (900 MHz). Les lots de plantes cultivés de manière identique dans ce caisson nous ont servi de références négatives et apparaissent sur chaque graphique sous l'intitulé « Témoins », ils sont exposés à un CEM résiduel très faible ($< 0,5 \text{ V.m}^{-1}$).

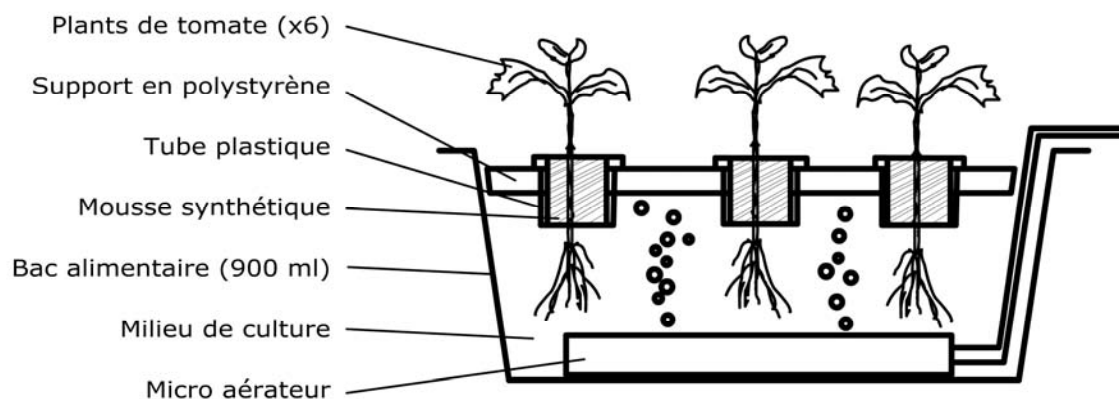


Figure 8 : dispositif de culture hydroponique des plantes. Chaque bac contient six plantules de tomate maintenues par un manchon de mousse expansive. Les plantules traversent une plaque de polystyrène flottant sur le milieu de culture brassé par un micro aérateur.

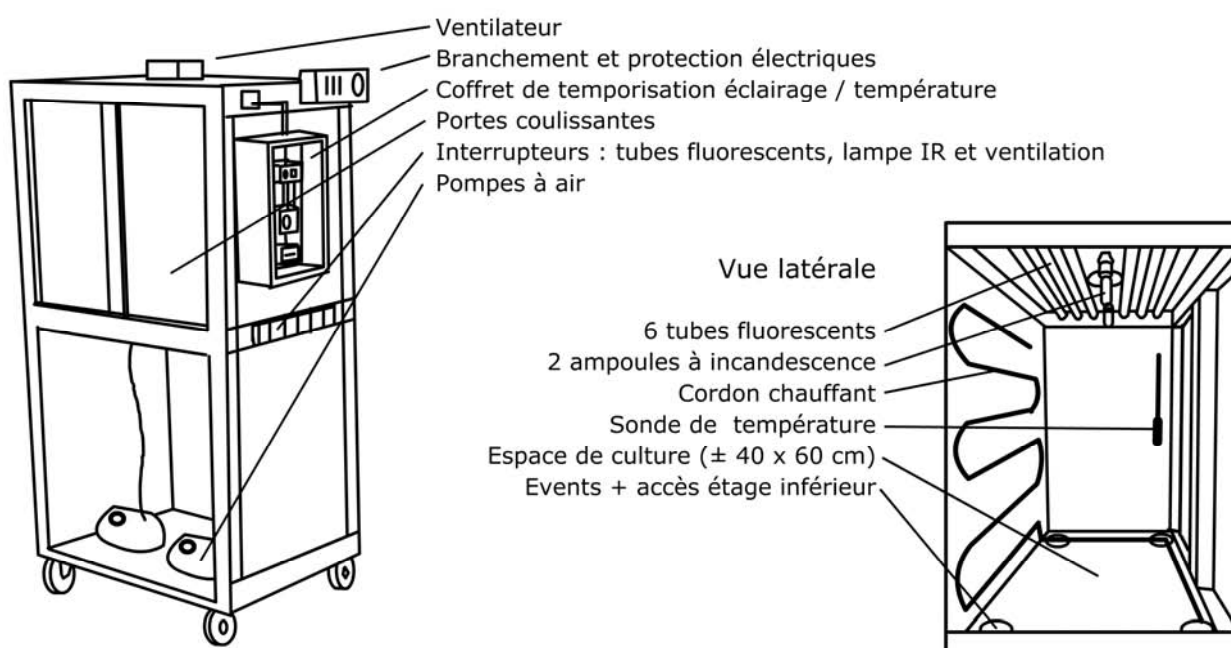


Figure 9 : schéma d'une chambre de culture. L'ensemble du dispositif, construit en bois, permet de réguler la température et l'éclairage durant la photopériode. L'espace interne peut recevoir huit bacs d'un litre pour la culture hydroponique (soit 48 plants de tomate). Le caisson « blindé » a été équipé sur ses parois internes d'un film souple multicouche et conducteur en aluminium n'affectant ni l'éclairage ni la régulation de température de l'espace interne.

2.2. Modification du milieu de culture

Pour certaines expériences, le milieu de culture standard a été modifié par l'ajout de composés chimiques et/ou la modification de sa concentration en calcium (Annexe 1). Les lots de plantes sont toujours transférés sur le milieu modifié fraîchement préparé au moins 18 heures avant l'exposition au CEM, en même temps que le transfert du caisson de culture dans la chambre de stimulation (cf. paragraphe suivant). Sept milieux différents ont été utilisés :

- un milieu standard avec une concentration en calcium de 0,73 mM.
- un milieu avec une concentration en calcium multipliée par 10 : 7,3 mM.
- un milieu sans calcium ajouté lors de la préparation nommé « 0 M ».
- un milieu sans calcium (0 M) contenant 0,5 mM d'EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), agent chélateur ayant une forte affinité pour le calcium, plus faible pour le magnésium (ajouté 90 minutes avant le traitement EM).
- un milieu sans calcium (0 M) contenant 0,4 mM de BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid), agent chélateur hautement spécifique du calcium.
- un milieu sans calcium (0 M) contenant 0,1 mM de LaCl_3 (chlorure de lanthane), inhibiteur des transporteurs membranaires du calcium.
- un milieu standard avec une concentration en calcium de 0,73 mM, contenant 200 μM de CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone), protonophore puissant, inhibiteur de la phosphorylation oxydative (inhibition de la production d'ATP, suppression du gradient membranaire de protons). Le CCCP a été incorporé au milieu 90 minutes avant exposition au CEM.

2.3. Récolte du matériel végétal et chronologie

Ce travail a eu pour objectif de limiter à une seule (le CEM) les variables expérimentales. Ainsi pour éviter toute perturbation induisant des biais expérimentaux dus à ces manipulations, les caissons de culture sont déplacés dans le volume utile de l'enceinte de traitement (Chambre Réverbérante à Brassage de Modes, CRBM) au moins 18 h avant la programmation d'une expérience. Chaque essai est conduit en milieu de photopériode pour éviter la perturbation des mesures par les activités rythmiques dues au début ou l'approche de la fin de l'éclairement. La récolte des échantillons s'est effectuée de la manière suivante (Figure 10) :

- des échantillons de référence (notés « R » sur les graphiques) sont récoltés juste avant le lancement de l'exposition au CEM. Ils représentent *la référence* (échantillons n'ayant pas subis d'exposition au CEM) à laquelle tous les autres échantillons seront relativisés en PCR quantitative.

- selon les expériences, les échantillons suivants (tests, exposés au CEM dans le caisson de culture standard) sont récoltés à des temps précis après la fin de l'émission du CEM : immédiatement à la fin du traitement (temps 0 minute, noté « 0 »), puis 5, 15, 30 et 60 minutes plus tard.

- les échantillons « témoins » sont manipulés et récoltés de la même manière (R, 0, 5, 15, 30, 60) mais proviennent de la chambre de culture équipée d'un blindage contre le CEM. Ils sont exposés à un CEM résiduel très faible (inférieur à $0,5 \text{ V.m}^{-1}$, cf. § Résultats 1.1).

Le matériel végétal se compose pour chaque échantillon de la 4^{ème} feuille émergente, prélevée avec précaution à l'aide d'une lame de scalpel (le stade 4^{ème} feuille sert de référence chronologique pour conserver une homogénéité au niveau de l'âge des plantes entre différentes expériences indépendantes). Chaque feuille est immédiatement référencée dans une pochette d'aluminium et plongée dans un bain d'azote liquide jusqu'à son stockage dans un congélateur à $- 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

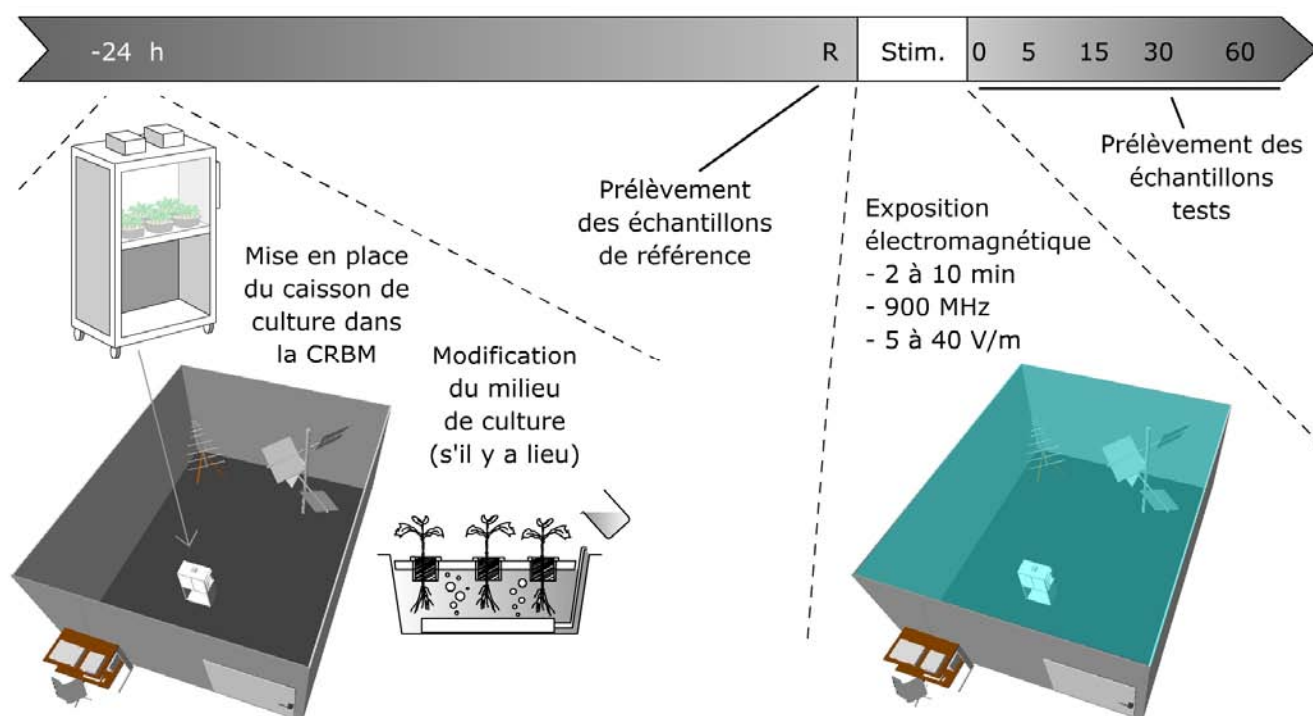


Figure 10 : chronologie des expériences. Les caissons de culture (standard ou blindé) sont installés dans la CRBM au moins 18 h avant l'émission du CEM. Si besoin, des composés sont ajoutés aux milieux de culture. Le prélèvement des échantillons de référence (non exposés) est immédiatement suivi par la simulation EM, puis par la récolte des échantillons tests.

3. Stimulation Électromagnétique

3.1. La Chambre Réverbérante à Brassage de Modes

Notre collaboration avec le LASMEA (LABoratoire des Sciences et Matériaux pour l'Électronique, et d'Automatique) a permis de réaliser les expériences dans des conditions optimales grâce à l'utilisation d'une Chambre Réverbérante à Brassage de Modes (CRBM ; Figure 11). Reconnue comme une alternative intéressante pour les mesures en électromagnétisme, la CRBM est capable de générer un environnement dont les caractéristiques sont proches des radiations électromagnétiques multidirectionnelles présentes dans le milieu urbain actuel (Otterskog et Madsén, 2003). Les parois sont constituées de panneaux de bois dont les faces internes et externes sont recouvertes de plaques d'acier soudées. L'ensemble, de part la continuité électrique, crée une cage de Faraday de grandes dimensions (l : 6,7 m ; h : 3,5 m ; p : 8,4 m soit $\pm 200 \text{ m}^3$). Cette propriété permet de s'affranchir complètement des pollutions électromagnétiques extérieures et d'empêcher la fuite des champs établis à l'intérieur, le tout dans un volume de travail important.

Cette installation nous permet de générer un champ électromagnétique, statiquement homogène et isotrope au sein d'un volume dit utile (Figure 3). Cela signifie que les objets placés dans le champ sont exposés depuis toutes les directions et avec la même amplitude ce qui garantit l'homogénéité du traitement entre différents échantillons et permet d'exposer chaque plante d'une manière globale.

Techniquement, la CRBM fonctionne sur le principe suivant (Figure 12) : un synthétiseur de fréquence envoie un signal sinusoïdal (900 MHz) à une antenne d'émission. Celle-ci constitue la source électromagnétique et génère dans la cavité des réflexions multiples qui créent, grâce à la présence du brasseur de modes (ondes) rotatif, un CEM uniforme.

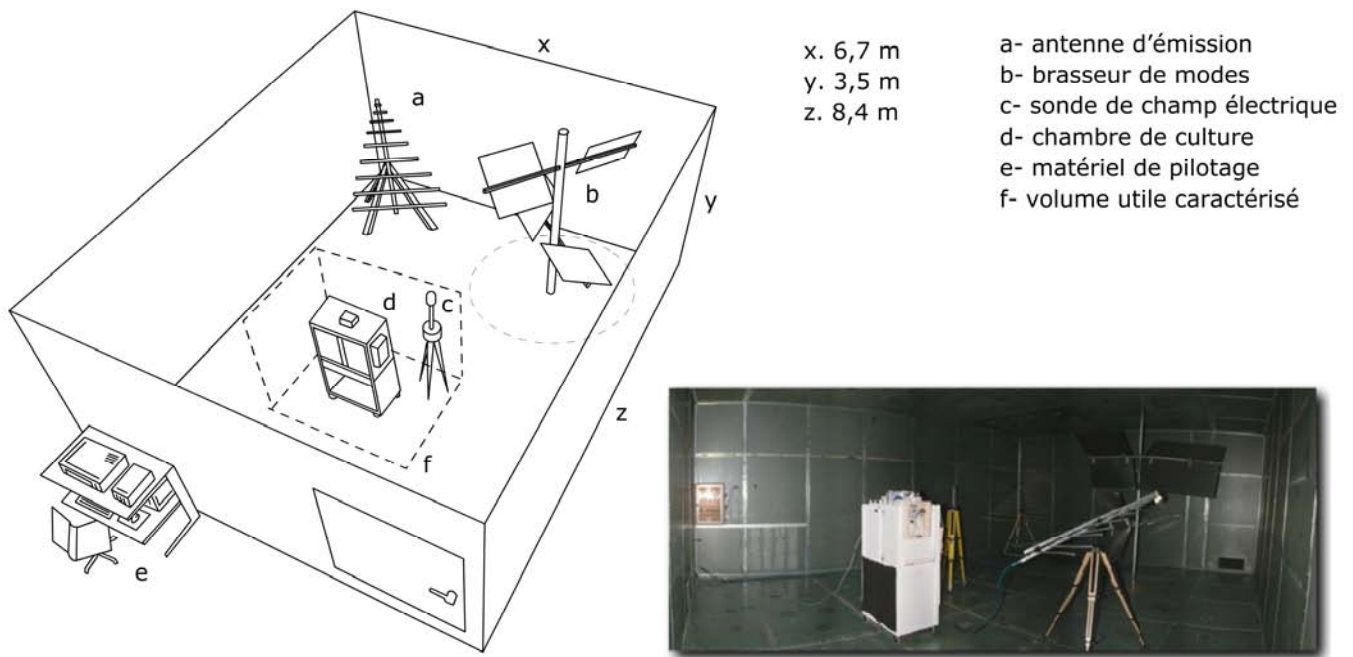


Figure 11 : schéma et photographie de la Chambre Réverbérante à Brassage de Modes.

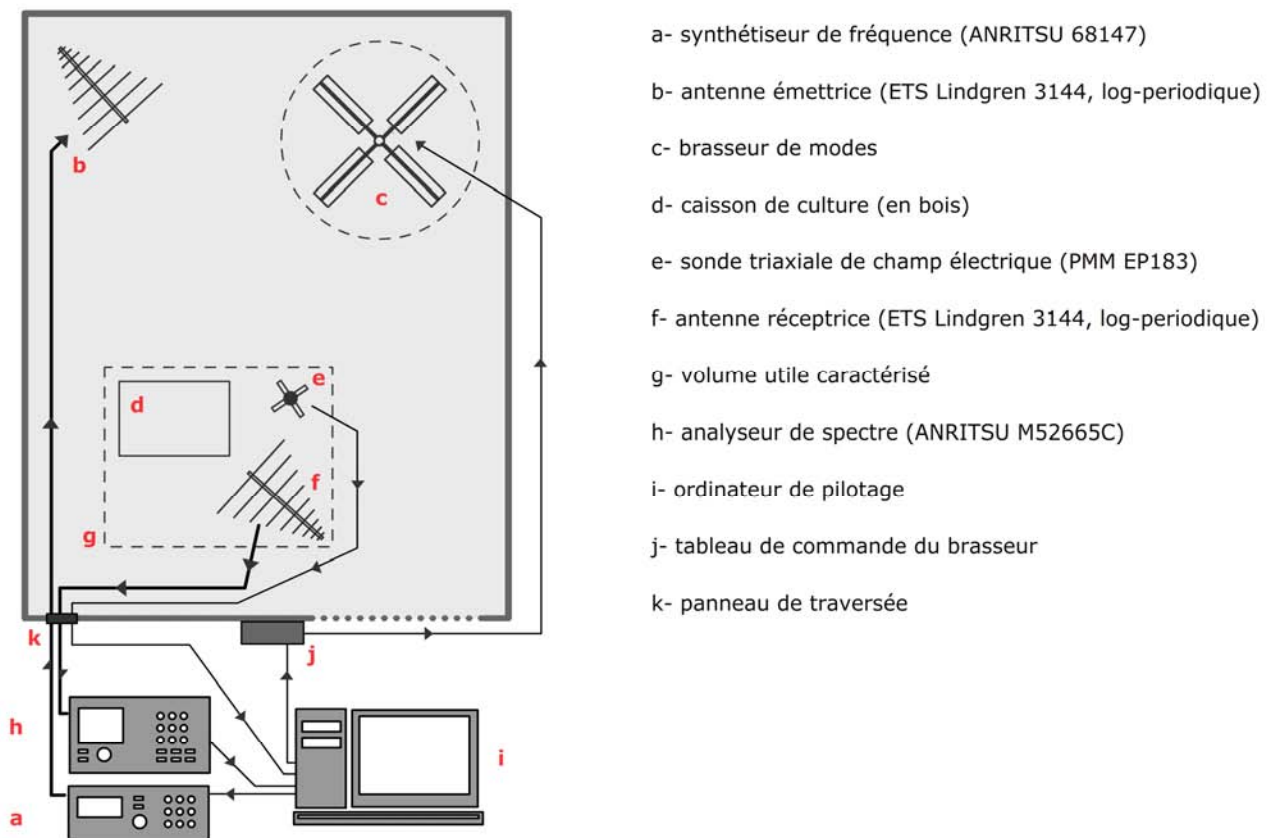


Figure 12 : schéma de l'équipement technique de la CRBM.

Le brasseur, composé de panneaux métalliques, modifie continuellement la géométrie de l'espace interne de la CRBM. Les chambres de culture sont installées au sein d'un volume caractérisé (volume dans lequel le CEM est homogène, isotrope, d'amplitude et de fréquence connues) dont les propriétés électromagnétiques sont contrôlées à l'aide d'une sonde de champ électrique triaxiale et d'une antenne de réception (reliée à un analyseur de spectres enregistrant la fréquence et la puissance globale). L'ensemble des instruments sont reliés à une interface (ordinateur de contrôle) qui permet de piloter l'ensemble. Des câbles spéciaux (blindés) sont utilisés pour la connexion des différents équipements à l'intérieur de la CRBM.

3.2. Caractérisation du CEM

Les CEM dans la CRBM ainsi qu'à l'intérieur des chambres de culture ont systématiquement fait l'objet de caractérisations précises de leurs propriétés. Il est important de vérifier que les conditions d'exposition EM restent semblables dans le temps et l'espace (à l'intérieur des deux caissons de culture). L'équipe du laboratoire de physique a conduit ces caractérisations dans tous les volumes utilisés en suivant le protocole préconisé par la norme IEC 61000-4-21 (IEC 2003). Cette démarche permet de définir les propriétés d'homogénéité et d'isotropie du CEM utilisé au sein du volume utile de la CRBM, ainsi qu'à l'intérieur des caissons de culture (standard et blindé). Le protocole consiste à vérifier que les variations des écart-types (σ) concernant l'amplitude du champ électrique selon les trois composantes spatiales (x, y et z) ainsi que pour le champ total ne dépassent pas le gabarit fixé par la norme IEC 61000-4-21 à 3 dB (cf. § Résultats 1). L'utilisation d'un champ uniforme (homogène et isotrope) contribue à assurer la stabilité et la répétitivité des conditions expérimentales.

Concrètement, nous avons mesuré le champ électrique (en décibel, dB) selon 8 positions de l'espace (Figure 13) au moyen d'une sonde triaxiale (Figure 12) pour une large gamme de fréquences et pour 51 positions du brasseur de modes.

Pour chaque couple « fréquence / position de la sonde » obtenu, 51 valeurs de champ ont été enregistrées selon les trois composantes rectangulaires du champ électrique : E_x , E_y et E_z ainsi que le champ total tel que : $E_t = \sqrt{(E_x^2 + E_y^2 + E_z^2)}$. Dans une situation idéale, la propriété d'homogénéité du champ est vérifiée lorsque l'amplitude E_t est identique aux huit points sondés, tandis que l'isotropie est garantie lorsque les amplitudes des trois composantes du champ électrique sont identiques en un point donné. Compte tenu des incertitudes de mesure, le CEM peut être considéré comme uniforme lorsque les écarts types des composantes du champ électrique et du champ total restent inférieurs au gabarit de 3 dB fixé par la norme, dans la gamme de fréquence étudiée. Nous avons également mesuré l'amplitude du champ résiduel à l'intérieur des caissons de culture pour évaluer l'atténuation causée par leurs parois et l'efficacité du blindage (cf. § Résultats 1.1).

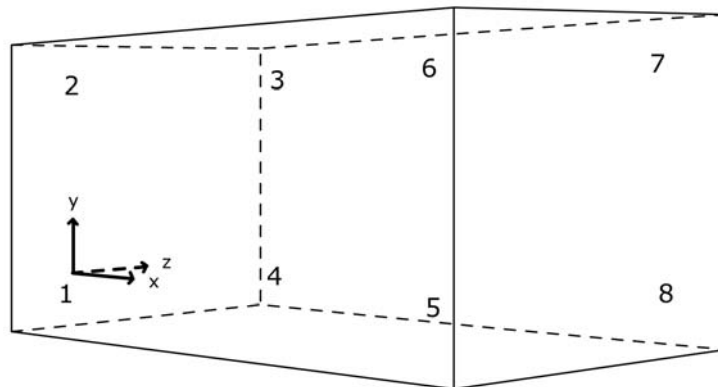


Figure 13 : caractérisation du CEM dans un volume utile. Le champ électrique est mesuré avec une sonde électrique triaxiale en 8 points de l'espace pour toute la gamme de fréquence utilisée par la CRBM et pour n positions du brasseur de modes.

4. Matrices pour la PCR quantitative

Chez les plantes et notamment la tomate, les variations d'abondance d'ARNm à la suite de stimuli blessants ont été largement décrites dans la bibliographie (Peña Cortés *et al.*, 1995 ; Stankovic *et al.*, 2000). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à transposer la mesure de ces paramètres en réponse à l'application d'un CEM HF. Nous avons préféré l'utilisation de la PCR quantitative en temps réel à d'autres techniques pour sa rapidité et sa précision. Nos travaux étant aussi basés sur l'étude d'ARNm et polysomiques, des étapes supplémentaires de transformation et de contrôle ont été nécessaires pour obtenir du matériel biologique correct. La bonne préparation des acides nucléiques (matrices) joue un rôle important dans le déroulement de l'amplification PCR.

Nous avons choisi des marqueurs de stress placés à différentes étapes de la chaîne d'événements cellulaires, tous clonés chez la tomate (Figure 14) :

- la calmoduline (calm-n6), clonée après blessure des inter-noeud (Depège *et al.*, 1997).
- une protéine kinase dépendante du calcium (lecdpk1) : clonée en réponse à une infection par un champignon, les ARNm de cette CDPK s'accumulent à la suite d'application de stress mécaniques (Chico *et al.*, 2002).
- un facteur de transcription de type « leucine zipper » (lebzip1) : cloné après brûlure de feuille (Stankovic *et al.*, 2000).
- un facteur de maturation des ARNm codant pour des protéines destinées au chloroplaste (CMBP), cloné après brûlure de feuille (Vian *et al.*, 1999).
- un gène effecteur très étudié (pin2) : l'inhibiteur de protéase de type 2 (Zhang *et al.*, 2004). Les inhibiteurs de protéase sont parmi les premiers acteurs caractérisés de la réponse au stress chez les plantes (Green et Ryan, 1972).

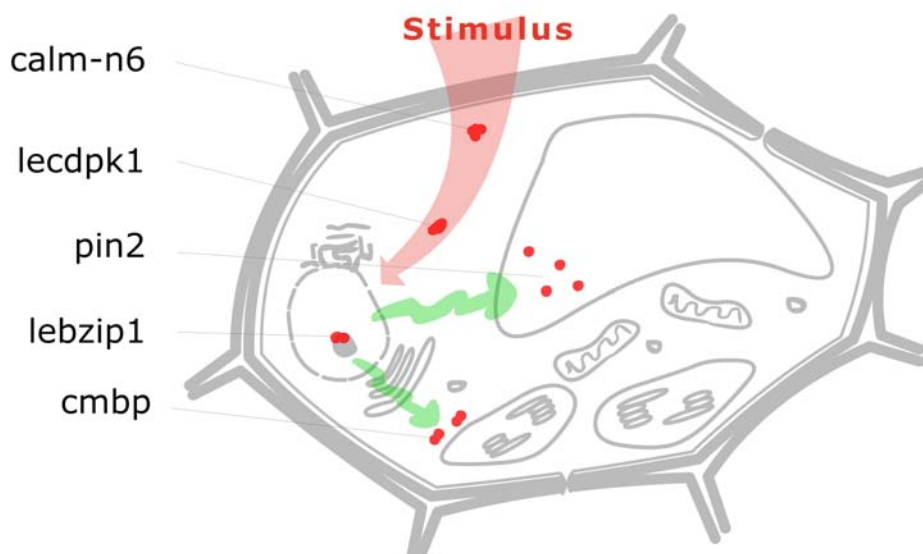


Figure 14 : situation des différents marqueurs étudiés au sein de la cellule. Chaque transcrit est figuré par sa protéine (en rouge) jouant un rôle à plus ou moins long terme dans la réponse.

4.1. Extraction des ARN Totaux

Les ARN totaux sont extraits selon le protocole SIGMA, initialement décrit par Chomczynski et Sacchi, 1987. Les échantillons encore congelés (4^{ème} feuille terminale) sont broyés et homogénéisés dans 1 ml de tampon d'extraction (TRI Reagent, SIGMA). Après ajout de 800 µl de chloroforme, une centrifugation permet de séparer en deux phases les ARN (phase aqueuse) des ADN, protéines, lipides et autres débris cellulaires (phase organique). Enfin, l'ajout de 700 µl d'isopropanol précipite les ARN et le culot obtenu par centrifugation est rincé par deux lavages successifs (2 x 200 µl) à l'éthanol 75 % (v/v) avant d'être repris dans 30 µl d'eau désionisée. Le protocole détaillé se trouve en Annexe 2.

4.2. Extraction des ARN polysomiques

L'extraction des ARN polysomiques nécessite un traitement des tissus beaucoup moins agressif que pour les ARN totaux de manière à conserver la structure polysomique (protocole décrit par Davies et Abe, 1995). Les échantillons sont préalablement broyés au mortier dans un bain d'azote liquide puis homogénéisés dans un tampon de stabilisation. Après centrifugation, le surnageant obtenu est déposé avec précaution sur 1 ml de saccharose 50 % dans un tube pour ultracentrifugation. Les ARN polysomiques présents dans le culot, obtenu après 4 heures d'ultracentrifugation (240.000 x *g* max, rotor TST-41.14, Kontron), peuvent alors être directement purifiés par la technique d'extraction d'ARN décrite précédemment. Le protocole complet d'extraction des ARN polysomiques est joint en Annexe 3.

4.3. Dosage et qualité des ARN

Les ARN messagers et polysomiques en solution dans l'eau désionisée sont dosés afin de vérifier leur pureté et leur intégrité est visuellement contrôlée par électrophorèse. L'absorption à 260 nm de solutions diluées au 1/500^{ème} est mesurée puis les volumes de chaque échantillon sont ajustés à une concentration finale de 1 µg / µl (la pureté des échantillons est vérifiée par le calcul du rapport des absorptions : 260 nm / 280 nm. Un rapport inférieur à 1,8 traduit une pollution par des protéines). Cinq µg d'ARN sont ensuite prélevés pour chaque échantillon, dénaturés (65°C) dans un tampon de charge en présence de bromure d'éthidium (BET), et déposés sur un gel d'agarose 1,3 % dénaturant. Après migration, leur qualité est évaluée sous rayons ultraviolets. Les protocoles complets se trouvent en Annexe 4.

4.4. Synthèse des ADN complémentaires

Les techniques de PCR étant fondées sur l'amplification de fragment d'ADN, il a été nécessaire pour ce travail de synthétiser des copies ADN de l'ARN. Cette étape de transcription inverse permet l'obtention d'ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARNm. Dans le cas de cette étude, nous avons choisi d'utiliser la technique de synthèse par amorces Oligo d(T) qui permettent, par hybridation sur l'extrémité poly-adénylique des ARNm, une synthèse du brin ADN complémentaire par la « reverse transcriptase ».

Nous avons utilisé le « Reverse Transcriptase Core Kit » (EUROGENTEC), protocole complet disponible en Annexe 5, pour réaliser la synthèse d'ADNc à partir d'1 µg d'ARN totaux. Après préparation des réactions dans des microtubes, ceux-ci sont placés dans un thermocycleur programmé de la manière suivante :

- étape initiale : 10 minutes à 25°C
- étape de transcription inverse : 30 minutes à 48°C (EuroScript RT)
- inactivation de l'enzyme : 5 minutes à 95°C.

En fin de synthèse, le volume des échantillons est porté à 100 µl par ajout d'eau distillée ce qui correspond à une concentration théorique maximum de 2 ng d'ADNc / µl.

5. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel (RTqPCR) est une technique récente de plus en plus utilisée pour quantifier finement les acides nucléiques. Le protocole repose sur la réalisation d'une PCR classique (amorces s'hybridant spécifiquement sur une séquence d'ADN donnée, matrice) en présence d'une molécule (SYBR Green) qui s'intercale entre les deux brins complémentaires de l'ADN néosynthétisé (Figure 15). Dans ce contexte, cette molécule peut être excitée par de la lumière bleue (λ : 490 nm), elle devient alors fluorescente et émet une lumière verte (λ : 520 nm). Le thermocycleur, équipé d'une lampe et d'un capteur lumineux, excite dans un premier temps les molécules de SYBR Green puis enregistre à chaque cycle la fluorescence émise en retour qui est fonction de la quantité de molécules double brin présente. Ainsi, dans un puits, plus la quantité d'ADN est grande au départ, plus la fluorescence est détectée de manière précoce par l'appareil, ce qui permet de quantifier relativement l'ADN entre les puits en terme de cycle seuil de détection (Ct). Nous avons utilisé le kit « qPCR Mastermix Plus for SYBR Green I with fluorescein » (EUROGENTEC) en suivant un protocole modifié disponible en Annexe 6.

5.1. Amorces PCR

a) Constructions

Les couples d'amorces PCR listés dans le Tableau 1 ont été construits semi-manuellement à l'aide des outils libres disponibles sur Internet :

1- Recherche d'information sur les gènes : interrogation de la base de données « Gene » sur le site du « National Center for Biotechnology Information » [NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov].

2- Récupération des séquences complètes des ARNm : interrogation de la base de données « CoreNucleotide » sur le site du NCBI (« Sequence Viewer »). Plusieurs séquences peuvent être comparées (alignées) avec l'application « ClustalW » [align.genome.jp], notamment pour repérer les régions non traduites (UTR).

Il peut être nécessaire d'obtenir la copie codante d'une matrice avec l'application « Reverse Complement » [www.bioinformatics.org].

3- Choix des amorces « sens » et « anti-sens » : utilisation de « Primer3 » [frodo.wi.mit.edu] et/ou « Primerquest » [IDT - eu.idtdna.com]. Des amorces spécifiques sont sélectionnées de préférence au sein des régions variables non traduites des ARNm (5'-UTR), spécialement lorsque le marqueur étudié appartient à une famille multigénique. Pour vérifier la spécificité des amorces, il faut ensuite interroger la base de données correspondante au génome du modèle étudié via l'interface « BLAST » sur le site du NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST]. La recherche ne doit renvoyer qu'une seule entrée (Accession number), c'est-à-dire un unique amplicon.

Chaque couple d'amorces doit présenter des propriétés proches des suivantes pour garantir une bonne efficacité d'amplification, ce qui est primordial pour l'analyse post PCR :

- longueur : 18 à 28 bases (influence spécificité et température de fusion).
- composition G + C : 50 à 60 % (influence la température de fusion, éviter les séquences répétées monobase (ex. CCC) qui sont instables).
- extrémité 3' se terminant par G, C ou GC (stabilisation de l'initiation, éviter de terminer par A ou T ce qui favorise les mauvais appariements).
- température de fusion : 55 à 68 °C (influence la température d'hybridation, ne pas dépasser 4°C de différence entre les deux amorces).
- structure : aucun dimère intra couple et/ou forme d'auto hybridation (hairpin), spécialement à l'extrémité 3' (cela gêne l'hybridation des amorces sur la matrice). Ceci peut être imposé à plusieurs niveaux avec « Primer3 » et « Primerquest » et vérifié visuellement avec l'application « GeneWalker » [www.cybergene.se].

Quelques contraintes s'appliquent à l'amplicon lui-même : 80 et 150 paires de bases et un pourcentage de base G-C compris entre 40 et 60 %, pour avoir une détection de la fluorescence et des efficacités d'amplification optimisées. Il est aussi nécessaire d'éviter les formes d'auto-appariements (Primer3).

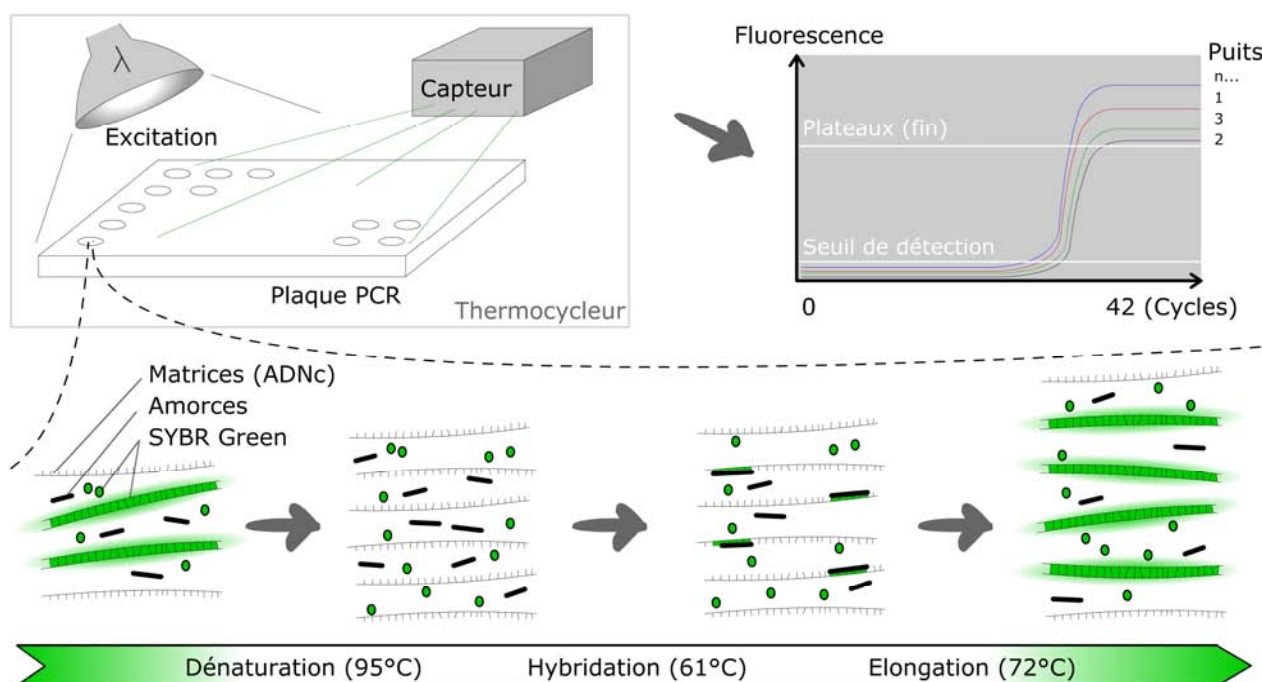


Figure 15 : principe de la PCR quantitative en temps réel. L'amplification des matrices d'ADNc est enregistrée par le thermocycleur grâce au SYBR Green, molécule fluorescente qui s'intercale entre les brins complémentaires des acides nucléiques. En théorie, la fluorescence émise double à chaque cycle jusqu'à épuisement du milieu réactionnel. Le thermocycleur renvoie en temps réel les courbes d'amplification qui représentent, pour chaque puits de la plaque PCR, l'évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycle PCR écoulés. Plus la quantité de matrices est importante au départ, plus la fluorescence est détectée tôt par l'appareil.

Gène et référence	ARNm	Accession	Amorce, 5' -> 3'
Actin isoform B (Itaya <i>et al.</i> , 2002)	actin	BM956640	sens GGG-ATG-GAG-AAG-TTT-GGT-GGT-GG anti-sens CTT-CGA-CCA-AGG-GAT-GGT-GTA-GC
Calmodulin N6 (Depège <i>et al.</i> , 1997)	calm-n6	Y14764	sens GAT-CGC-TGA-GTT-CAA-GGA-GGC-TTT-C anti-sens CAC-CTC-GTT-TAT-CAT-GTC-CTG-GAG-C
Lycopersicon esculentum Calcium dependent protein kinase 1 , (Chico <i>et al.</i> , 2002)	lecdpk1	AF363784	sens GCT-AAT-AAT-GGG-CAC-CAT-GGA-TC anti-sens TGG-TTT-TGG-GCT-TGG-TGG-AGG-TC
Chloroplast mRNA binding protein (Vian <i>et al.</i> , 1999)	cmbp	AF106660	sens ATT-ATG-ACC-CTA-GGA-G anti-sens TCA-TAT-CGC-TCT-TCC-G
Lycopersicon esculentum basic leucine zipper 1 (Stankovic <i>et al.</i> , 2000)	lebzip1	AF176641	sens TCC-ACA-CCC-TTG-ATG-CGG-AGA-AC anti-sens CAG-GGA-TGT-CGA-CAG-CAA-GTC-CA
Proteinase inhibitor II (Zhang <i>et al.</i> , 2004)	pin2	AY129402	sens GCC-TAT-TCA-AGA-TGT-CCC-CGT-TCA-C anti-sens CCT-TGG-GTT-CAT-CAC-TCT-CTC-CTT-C

Tableau 1 : liste des couples d'amorces PCR utilisés, leurs séquences et les références bibliographiques associées.

b) Températures d'hybridation

De manière à avoir des efficacités d'amplification équivalentes (condition nécessaire pour la PCR quantitative), chaque RTqPCR doit être paramétrée selon une température d'hybridation compatible pour les différents couples d'amorces utilisés simultanément (gène cible et actine), avec une tolérance à l'écart de ± 5 %. La température d'hybridation optimale pour chaque groupe « amorces / ADNc cible » s'obtient par PCR en appliquant un gradient de température au niveau du bloc du thermocycleur.

Nous obtenons une série de courbes dont celles qui présentent les plateaux les plus élevés (meilleures amplifications) indiquent la fourchette de température idéale d'hybridation pour les amorces considérées (cf. § Résultats 1.2).

5.2. Méthode d'analyse

Le thermocycleur produit pour chaque puits des données brutes sous forme de « Ct » (threshold cycle), c'est-à-dire le cycle seuil de PCR à partir duquel la fluorescence est détectée. La valeur de Ct est d'autant plus élevée que la quantité d'acide nucléique est faible au départ. Nous analysons ces données pour calculer les quantités relatives de chaque marqueur grâce à la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

L'analyse Ct selon la formule du $2^{-\Delta\Delta Ct}$, décrite par Livak et Schmittgen, 2001, est une méthode fiable et répandue dans la bibliographie (Arocho *et al.*, 2006 ; Ballester *et al.*, 2004). Elle s'applique typiquement lorsqu'une série d'échantillons doit être comparée à un échantillon témoin qui n'a pas subi de traitement. Tous les échantillons tests sont alors relativisés par rapport à celui-ci (la référence). Cette méthode permet de normaliser l'ensemble des données à celles fournies par un marqueur choisi comme référence invariable tout au long de l'expérience, (Figure 16). Dans notre cas, les données recueillies sont relatives à l'échantillon de référence (R) récolté juste avant l'émission du CEM et c'est l'ARNm actin qui sert de norme invariable.

$$Q_r = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{test}})_i - \Delta Ct_{\text{réf}}$$

$$\Delta Ct_{\text{test}} = Ct_{\text{échantillon i test}} - Ct_{\text{échantillon i actin}}$$

$$\Delta Ct_{\text{réf}} = Ct_{\text{échantillon "R" test}} - Ct_{\text{échantillon "R" actin}}$$

Figure 16 : calcul simplifié de la quantité relative (Q_r) d'un échantillon à partir des valeurs de cycle seuil de détection (Ct), méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$, (Livak et Schmittgen, 2001). Les ΔCt_{test} représentent le Ct renvoyé par le marqueur cible duquel est soustrait le Ct du marqueur actine (norme). Ensuite, pour chaque série d'échantillons, un seul et unique $\Delta Ct_{\text{réf}}$ est calculé en soustrayant la valeur Ct de l'échantillon de référence actine de la valeur Ct de l'échantillon de référence du marqueur testé (R, non exposé au CEM), ce chiffre est finalement soustrait de chaque ΔCt_{test} pour obtenir un $\Delta\Delta Ct$.

Les résultats obtenus sont exprimés en quantité relative (noté Qr). Pour chaque expérience, nous avons réalisé au moins trois essais indépendants de manière à calculer une Qr moyenne. De plus, pour chaque essai la Qr d'un échantillon est calculée à partir de la moyenne de deux Ct : chaque échantillon est testé en duplicata sur la plaque PCR.

5.3. Efficacités d'amplification

La méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nécessite qu'une condition particulière soit vérifiée pour pouvoir être appliquée : les couples d'amorces utilisés ensembles doivent présenter des efficacités d'amplification égales. Nous avons précédemment recherché une température d'hybridation compatible pour les deux couples d'amorces, ce qui tend à homogénéiser les efficacités d'amplification. Cependant, pour vérifier que le couple d'amorces utilisé pour chaque gène possède la même efficacité d'amplification que le couple d'amorces « actin » nous avons utilisé la méthode du ΔCt (dérivée du $2^{-\Delta\Delta Ct}$) décrite par les mêmes auteurs (Livak et Schmittgen, 2001).

Nous avons réalisé une RTqPCR sur une plaque contenant des concentrations croissantes d'ADNc puis nous avons calculé des ΔCt de la manière suivante :

$$\Delta Ct = Ct_{\text{échantillon gène cible}} - Ct_{\text{échantillon actin}}$$

Une droite d'équation $\Delta Ct = f(-\log [ADNc])$ est ensuite construite. La pente de cette droite indique le rapport entre les efficacités d'amplification des deux couples d'amorces testés. Si cette pente est nulle, les efficacités sont identiques, ce qui valide l'utilisation de la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Nous avons réalisé des tests statistiques de pente (test de Student) pour vérifier cette dernière condition, (méthode de calcul présentée en en Annexe 7).

La valeur observée du test se calcule de la manière suivante, avec **pen**te = pente de la droite d'équation « $\Delta Ct = f(-\log [ADNc])$ » ; **SCER** = Somme des Carrés des Ecart

$$t_{obs} = \frac{|pen\text{te} - 0|}{\sqrt{\frac{SCER}{(n-2) SCE \times x}}}$$

La valeur théorique s'obtient dans la table de Student inverse pour une probabilité limite de 5 % et 3 degrés de liberté, soit **t**_{théo} = 3,18. Il suffit ensuite de comparer les valeurs **t**_{obs} et **t**_{théo} : si **t**_{obs} est compris dans l'intervalle défini entre - **t**_{théo} et + **t**_{théo}, la pente de la droite est statistiquement nulle au risque 5 %. Dans ce cas, la méthode d'analyse du 2^{- $\Delta\Delta Ct$} peut s'appliquer aux RTqPCR réalisées avec le couple d'amorces considéré et le marqueur invariant « actin ». Dans le cas où les efficacités d'amplification divergent, il est nécessaire de recourir à des méthodes d'analyse différentes, de quantification absolue.

6. Charge énergétique adénylique

6.1. Extraction des nucléotides libres

Nous avons repris la méthode utilisée par Henry-Vian *et al.* (1996) initialement décrite par Keppler *et al.* (1970) : les échantillons congelés sont préparés au mortier dans de l'azote liquide. Le broyat obtenu est homogénéisé dans 500 µl d'acide perchlorique 0,6 M (HClO₄) puis le tout est centrifugé 10 minutes à 10 000 x g. Le surnageant est ensuite récupéré puis le pH est neutralisé par ajout de bicarbonate de potassium (KHCO₃). Le précipité de perchlorate de potassium (KClO₄) est éliminé par centrifugation (5 minutes à 10 000 x g) pour conserver le surnageant qui contient les nucléotides libres (protocole d'extraction et de dosage détaillé disponible en Annexe 8).

6.2. Dosage de l'ATP

Nous avons utilisé le kit « ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II » (ROCHE) pour doser l'ATP selon le principe suivant : l'oxydation de la luciférine, catalysée par la luciférase, conduit à une émission lumineuse dépendante de la présence d'ATP (Pradet, 1967). Cette propriété permet le dosage rapide de l'ATP à des concentrations très faibles de l'ordre du picomolaire, grâce à un luminomètre. Les résultats sont obtenus en unités de luminescence (ul). Le dosage précis de l'ATP se fait par la comparaison des valeurs obtenues avec celles d'une droite étalon construite à partir d'une série de solutions d'ATP de concentrations connues.

6.3. Dosage enzymatique des nucléotides : principe

Nous avons calculé la Charge Energétique Adénylique (CEA) grâce au dosage des trois nucléotides : AMP, ADP, ATP. Pour l'AMP et l'ADP, ces dosages sont réalisés de manière indirecte (Pradet, 1967).

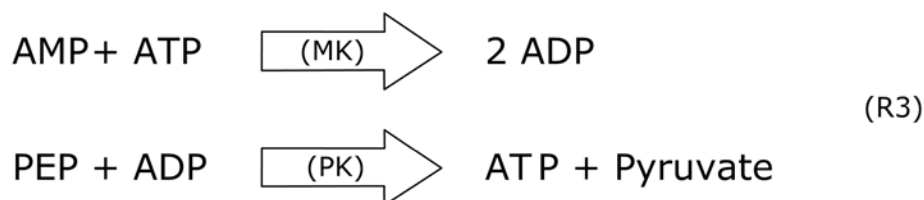
Pour chaque échantillon, récolté selon le même protocole que décrit précédemment, nous avons réalisé quatre préparations, cf. Tableau 2. Puis nous avons mesuré la luminescence émise dans chaque puits (cf. dosage de l'ATP) et calculé les proportions de chaque nucléotide de la manière suivante :

- les préparations **R1** et **R4** ne mettent pas en jeu de réaction enzymatique : la première nous permet de mesurer la luminescence produite par l'ATP contenu dans l'échantillon (bruit de fond) et la seconde celle émise par une concentration d'ATP donnée ; elle sert de témoin interne.

- la **réaction 2** contient l'enzyme Pyruvate kinase (pk). En transformant l'ADP en ATP, elle renvoie les ul produites par l'ADP et l'ATP de l'échantillon.



- la **réaction 3** met en jeu les enzymes Myokinase (MK) et Pyruvate kinase (PK) permettant la transformation de l'AMP en ADP puis en ATP. Ce qui permet de mesurer les ul produites par l'AMP et l'ADP de l'échantillon.



Ainsi, la luminescence produite par l'ADP de l'échantillon s'obtient par la soustraction : **R2 – R1**. Puis les ul produites par l'AMP se calculent avec la soustraction : **R3 – R2**. Enfin, un dernier calcul permet d'obtenir la Charge Energétique Adénylique :

$$\text{CEA} = (\text{ATP} + \frac{1}{2} \text{ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$$

Cette formule a été proposée par Atkinson (1968) et permet de décrire de manière universelle l'état de l'équilibre énergétique des cellules d'un organisme. La CEA peut théoriquement varier de 0 (plus d'énergie disponible car tout est transformé en AMP) à 1 (énergie maximale disponible, tout sous forme d'ATP). En pratique, le rapport calculé pour un échantillon frais de matière vivante oscille autour de 0,8 – 0,9.

6.4. Dosages enzymatiques des nucléotides : préparation

Les quatre réactions sont préparées pour 96 échantillons (plus une marge de 20 %) en aliquots de 5,7 ml (Tableau 2) et déposées sur une plaque 96 puits blanche et opaque. Pour cette étude, une expérience se compose de 4 échantillons (R, 15, 30, 60), chacun d'eux subit les 4 réactions en triplicata soit un total de 48 puits. Nous déposons 50 µl de réactif (I, II, III ou IV) dans chaque puits et 10 µl d'échantillon. Après 15 minutes, 40 µl de tampon contenant la luciférase sont distribués automatiquement par le luminomètre juste avant la mesure de la luminescence. L'utilisation d'un luminomètre pour plaque 96 puits (microplate luminometer Eg & G Berthold LB96V) permet d'automatiser un dépôt rapide de tampon luciférase et donc d'éliminer les variabilités dues au « pipetage » et au temps (degrés d'avancement des réactions enzymatiques).

(Volume final: 5,7 ml)	R 1	R 2	R 3	R 4
Eau	2,7 ml	2,7 ml	2,7 ml	2,4 ml
PEP (0,15mM)	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
PK	*	1 µl (= 11,7 u)	1 µl (= 11,7 u)	*
MK	*	*	1 µl (= 4,7 u)	*
ATP (1 pmol/µl)	*	*	*	0,3 ml

Tableau 2 : dosages enzymatiques des nucléotides. Réactions pour le dosage enzymatique des nucléotides libres, quantités calculées pour 96 puits + 20 %. PEP : phospho-enol-pyruvate ; PK : pyruvate kinase ; MK : myokinase ; u : unité enzymatique.

RESULTATS ::

1. Caractérisations et validations expérimentales

1.1. Caractérisation des champs électromagnétiques

Les propriétés d'homogénéité et d'isotropie du CEM ont été vérifiées à la fois pour la CRBM (Figure 17) ainsi que pour les caissons de culture (Figure 18). Il a été nécessaire de déterminer dans quelles mesures ces propriétés étaient affectées par la structure des caissons de culture, bien que ceux-ci aient été construits avec l'objectif d'être le moins influents possible sur les propriétés du CEM. Toutes les mesures ont été réalisées au sein du volume utile de la CRBM. Nous avons vérifié l'homogénéité et l'isotropie du CEM avec la méthode d'analyse des écart-types décrite précédemment. L'ensemble des variations demeurant sous la limite de 3 dB (Figure 17 et Figure 18), le CEM à l'intérieur du volume de la CRBM tout comme au sein des caissons de culture peut être considéré comme homogène et isotrope (Figure 3). De plus, les intensités des champs électriques résiduels ont été mesurées à l'intérieur du caisson de culture standard et du caisson blindé : il apparaît que pour une amplitude générée de 5 V.m^{-1} dans la CRBM, les parois du caisson standard (non blindé) causent une perte d'environ 20 % de l'amplitude du CEM. L'amplitude résiduelle à l'intérieur du caisson est alors de 4 V.m^{-1} . Pour le caisson blindé, l'amplitude du champ interne ne dépasse jamais $0,5 \text{ V.m}^{-1}$, soit une atténuation supérieure à 87 % (Figure 19).

En conclusion, seule l'amplitude du champ est affectée par la structure des caissons de culture, le CEM à l'intérieur de ceux-ci conserve ses propriétés d'homogénéité et d'isotropie. De plus, le blindage que nous utilisons pour l'un des caissons a démontré son efficacité. En résumé, les champs générés lors des stimulations réalisées dans le cadre de ces travaux ont toujours présenté les caractéristiques suivantes : homogénéité, isotropie et une fréquence de 900 MHz.

Sauf mention contraire, les amplitudes mentionnées dans ce rapport (5 V.m^{-1} , 40 V.m^{-1}) correspondent aux valeurs moyennes *générées* dans le volume utile de la CRBM, elles sont fonction de la puissance transmise à la structure.

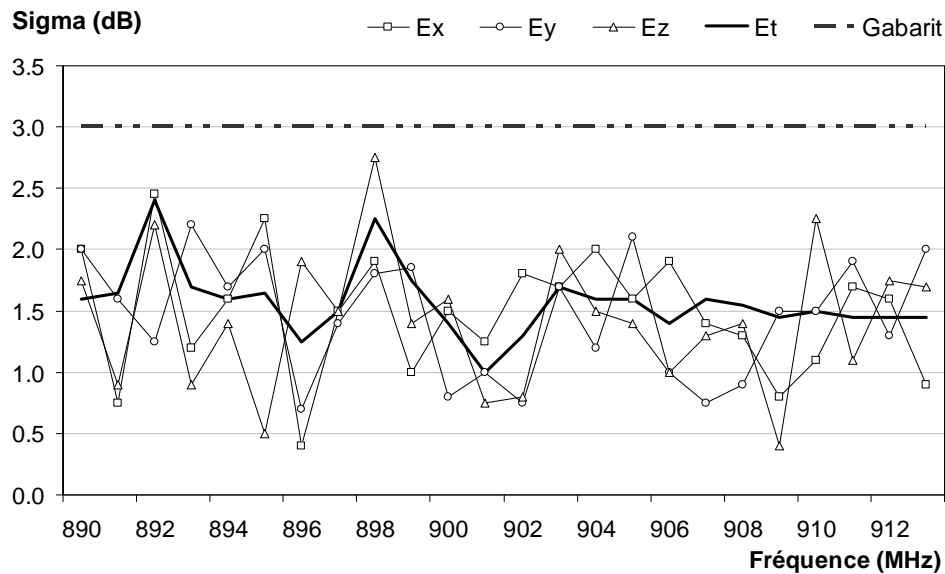


Figure 17 : homogénéité et isotropie du CEM au sein de la CRBM à vide. Le champ électrique est mesuré selon les trois composantes de l'espace (et ceci pour 8 positions de sonde x 51 positions du brasseur de modes x « n » fréquences du champ). Pour toute la gamme de fréquence, les variations des écart-types doivent rester sous le gabarit fixé par la norme EIC-61000-4-21 pour valider les caractéristiques d'isotropie et d'homogénéité du CEM.

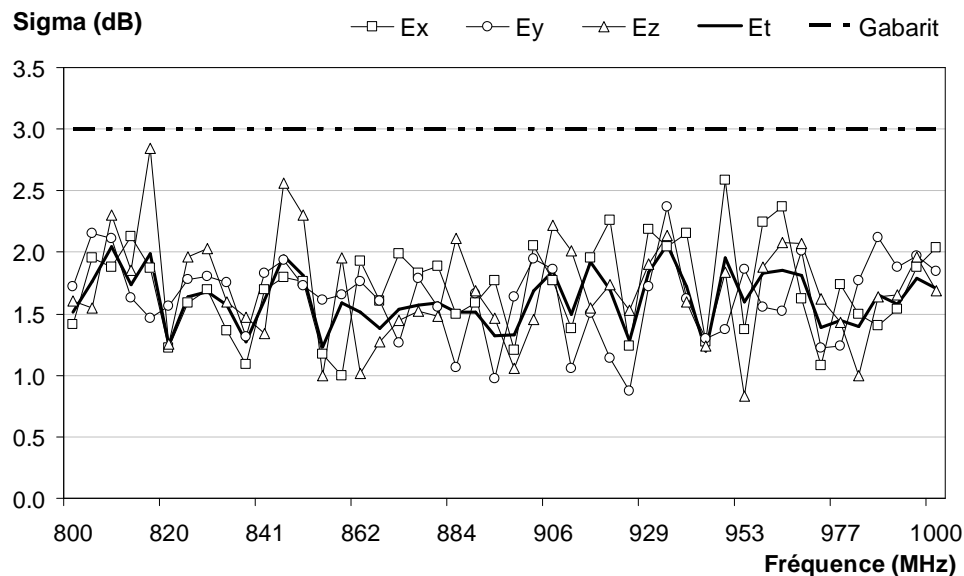


Figure 18 : homogénéité et isotropie du CEM au sein d'une chambre de culture. Le protocole de mesure est identique à celui décrit pour l'analyse du CEM dans la CRBM.

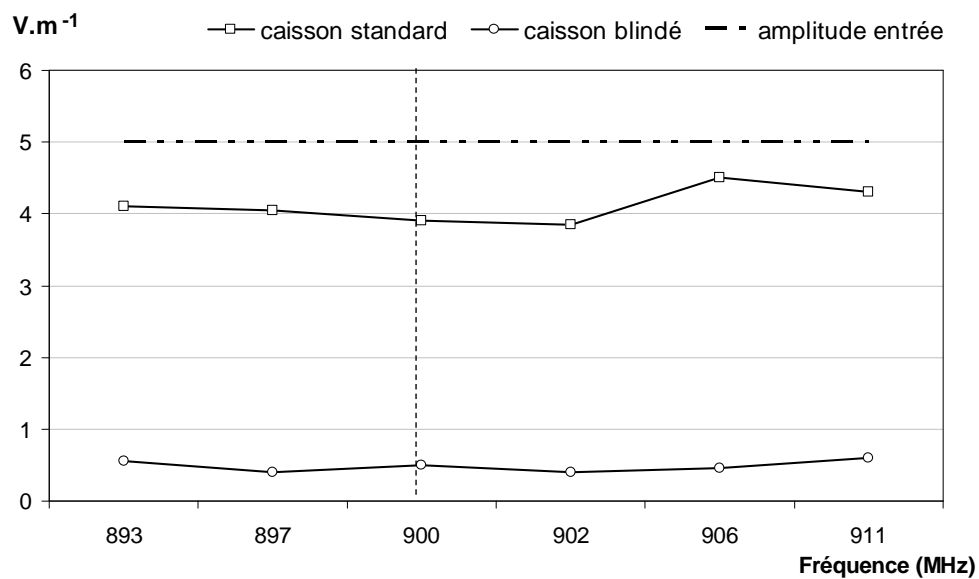


Figure 19 : *champ électrique résiduel à l'intérieur des caissons de culture standard et équipé du blindage en aluminium (blindé) en fonction de la fréquence du CEM et pour une amplitude émise de 5 V.m^{-1} .*

1.2. Prérequis à la PCR quantitative

a) Températures d'hybridation

L'utilisation de différents couples d'amorces en PCR quantitative se fait à une température donnée. Celle-ci ayant une influence sur l'efficacité d'amplification des amorces, nous devons déterminer des températures d'amplification optimales (par PCR en gradient de température). L'exemple de la Figure 20 pour le gène *lebzip1* renvoie une température optimale d'hybridation comprise entre 61,4°C et 64,5°C. Ces tests ont été réalisés pour chaque gène :

- **actin** : 61,4 à 64,5°C
- **calm-n6** : 57 à 61,4°C
- **lecdpk1** : 57 à 61,4°C
- **cmbp** : 57,9 à 64,5°C
- **pin2** : 61,4 à 64,5°C

Ainsi, une température moyenne de 61°C a été retenue pour l'ensemble des RTqPCR.

b) Efficacités d'amplification

L'exemple de la Figure 21 concerne le marqueur *lecdpk1*. La droite tracée renvoie une valeur de pente de 0,37 ce qui correspond à un t_{obs} de 1,23. Nous pouvons considérer la valeur de cette pente comme nulle puisque : $- 3,18 < 1,23 < + 3,18$. La méthode d'analyse du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ peut donc s'appliquer aux RTqPCR réalisées avec le couple d'amorces *lecdpk1* en prenant comme marqueur invariant l'actine. Ceci a également été validé pour chaque couple d'amorces utilisé dans ce travail. Plus le choix des amorces est rigoureux au départ, plus il est aisé ensuite d'utiliser les couples d'amorces simultanément en quantification relative. Dans le cas où les efficacités d'amplification divergent, il est nécessaire de recourir à des méthodes d'analyse différentes, de quantification absolue.

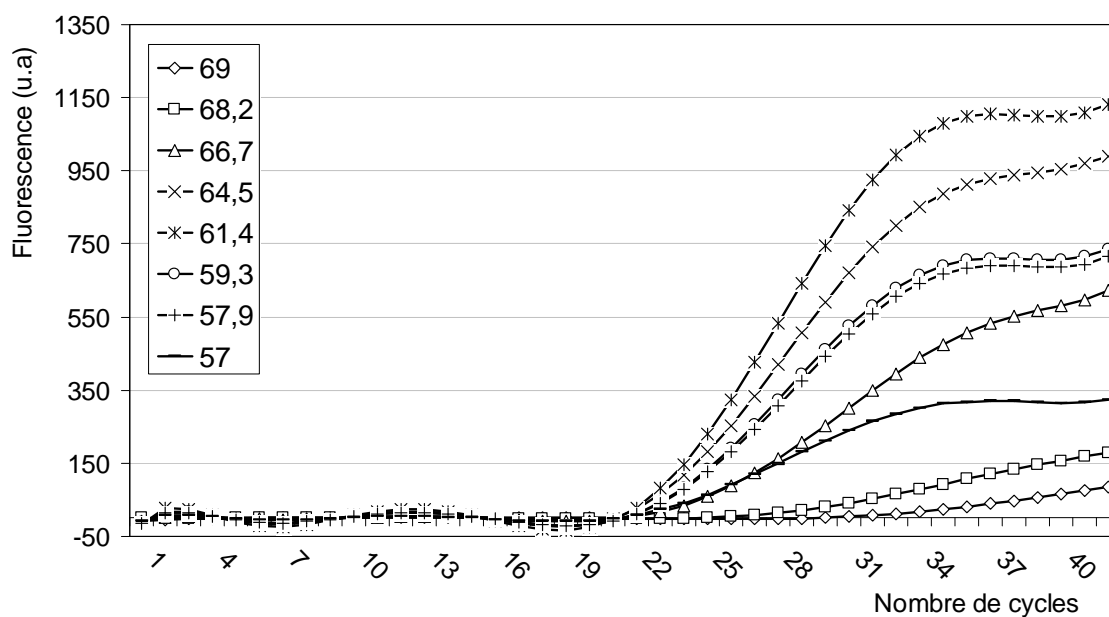


Figure 20 : détermination de la température d'hybridation optimale pour le marqueur lebzip1.
 Courbes de températures obtenues par RTqPCR en gradient de température sur des échantillons de même concentration. Pour les amorces lebzip1, l'hybridation s'effectue préférentiellement entre 61,4°C et 64,5°C.

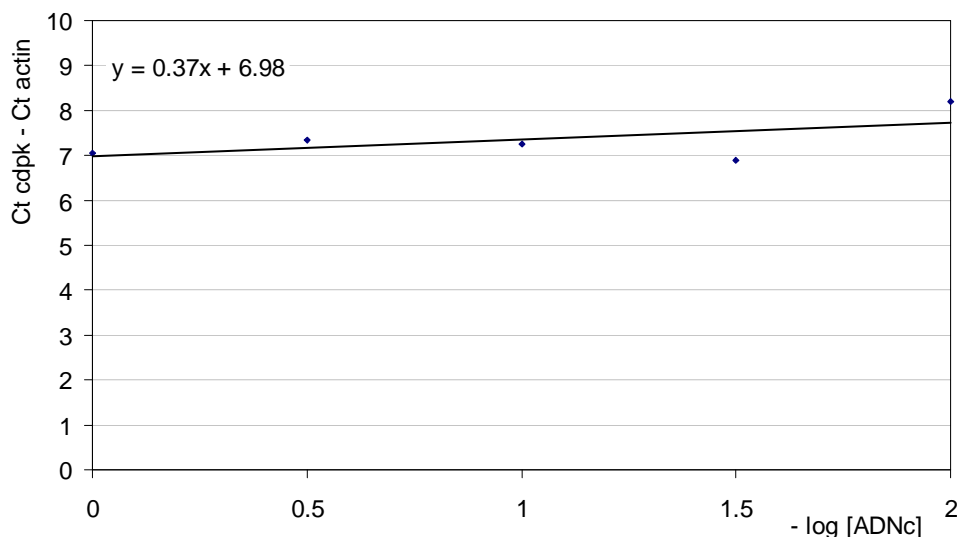


Figure 21 : test d'efficacité d'amplification des couples d'amorces lecdpk1 / actin. Après une RTqPCR sur des dilutions d'ADNc, la droite d'équation $\Delta C_t = f(-\log [ADNc])$ permet de vérifier que la méthode du $2^{-\Delta C_t}$ peut être utilisée sur les couples d'amorces considérés.

1.3. Mesure de la température au cours de l'exposition EM

De manière à vérifier l'innocuité de la température dans les expériences EM, nous avons mesuré la température d'un limbe d'un même plant de tomate soumis ou non au CEM (Figure 22) toutes les trente secondes pendant 10 minutes (à l'aide d'une fine sonde thermocouple et d'un afficheur numérique). Ces mesures montrent que les températures oscillent très peu et restent statistiquement identiques en moyenne : **22,06 °C ± 0,01** (erreur standard) sous action du CEM et **22,04 °C ± 0,01** sans CEM.

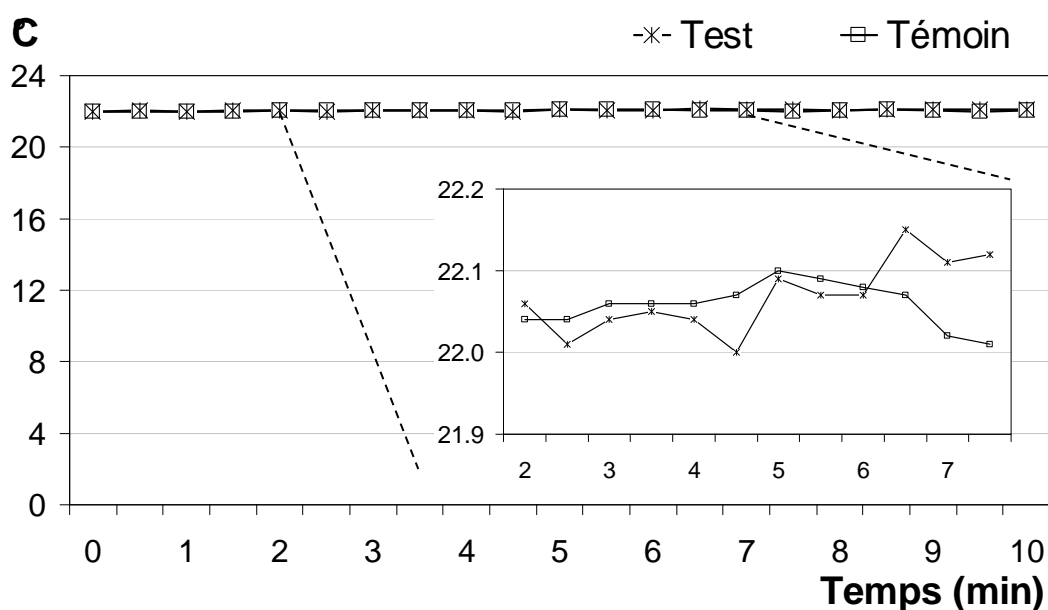


Figure 22 : mesures de température au cours des essais. La température à l'intérieur de la tige d'un plant de tomate a été mesurée sous exposition EM (Test) et sans CEM (Témoin). Le graphique présente les températures observées à deux échelles différentes.

2. Abondance d'ARNm en réponse au CEM HF

Ce travail a débuté par la mesure des variations d'abondance d'ARNm de gènes impliqués dans la physiologie du stress chez les végétaux. Après exposition des plantes au CEM, nous avons quantifié des ARNm cibles par PCR quantitative en temps réel (RTqPCR). Les conditions choisies comme standards pour ce travail sont : un CEM homogène, isotrope, de fréquence 900 MHz et d'amplitude 5 V.m^{-1} et produit pendant 10 minutes. Nous n'avons appliqué aucune modulation particulière du signal principal.

Des échantillons de référence (R) sont récoltés juste avant l'émission du CEM puis les échantillons tests/témoins sont prélevés dès la fin du traitement et suivant des temps fixés (0, 5, 15, 30 et 60 minutes). Chaque graphique représente l'abondance relative d'ARNm (marqueur moléculaire) par rapport à la valeur de référence (R). L'ensemble des données est normalisé par rapport au marqueur « actin isoforme B » (actin), tel que décrit dans *matériel et méthodes*. Les valeurs représentent la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes plus ou moins l'erreur standard.

Deux conditions sont présentées :

- la condition « Tests » représente les plantes traitées et cultivées à l'intérieur du caisson de culture perméable au CEM (amplitude du champ à l'intérieur : 4 V.m^{-1} , cf. Matériel et Méthodes).
- la condition « Témoins » représente les plantes traitées de la même manière mais cultivées à l'intérieur du caisson blindé opaque au CEM (dans lequel nous avons mesuré un CEM résiduel de $0,5 \text{ V.m}^{-1}$).

Nous avons choisi les marqueurs selon l'étape où la protéine pour laquelle ils codent intervient dans la réponse cellulaire. Le premier marqueur que nous avons étudié, qui intervient en théorie le plus tardivement, est l'inhibiteur de protéase (pin2), marqueur typique du stress cellulaire chez les plantes et notamment la tomate (Zhang *et al.*, 2004). L'exposition des plantes au CEM donne lieu à l'apparition de deux pics d'accumulation significatifs des ARNm pin2 (Figure 23), le premier 15 minutes après la stimulation électromagnétique (4,2 fois la valeur de référence) et le second au point 60 minutes (3,4 fois). Les trois autres valeurs (temps 0, 5 et 30 min) restent très proches des valeurs témoins.

A la suite de ces premiers résultats nous avons souhaité modifier certains paramètres du CEM (amplitude et durée) de manière à évaluer leurs influences sur la réponse observée. Pour ces expériences, nous avons soumis des lots différents de plantes à un CEM d'amplitude 5 V.m^{-1} pendant 2 minutes ainsi qu'à un CEM d'amplitude 40 V.m^{-1} pendant 10 minutes, tous deux sans modification de la fréquence (900 MHz). Les plantes témoins ont été protégées du CEM (plantes cultivées dans le caisson de culture blindé). Comme décrit dans *matériel et méthodes*, ces plantes ont été exposées à CEM résiduel de $0,5 \text{ V.m}^{-1}$.

La Figure 24 regroupe les différents résultats et montre des augmentations importantes de l'accumulation des ARNm pour les conditions à plus forte énergie (5 V.m^{-1} et $40 \text{ V.m}^{-1} - 10 \text{ min}$). Pour ces deux conditions, nous observons des premiers pics d'accumulation significatifs 15 minutes après la fin du traitement qui présentent des valeurs très comparables : 4,2 et 5 fois les valeurs de référence (Figure 24, point 15). Après un retour aux valeurs témoins (point 30) une seconde accumulation, plus faible mais toujours importante, est observée 60 minutes après la fin du traitement, là aussi avec des valeurs très proches pour les deux conditions : 3,4 et 3,6 fois la valeur de référence (point 60). En revanche, nous n'observons pas d'accumulation pour les plantes soumises au CEM d'amplitude 5 V.m^{-1} et de durée 2 minutes.

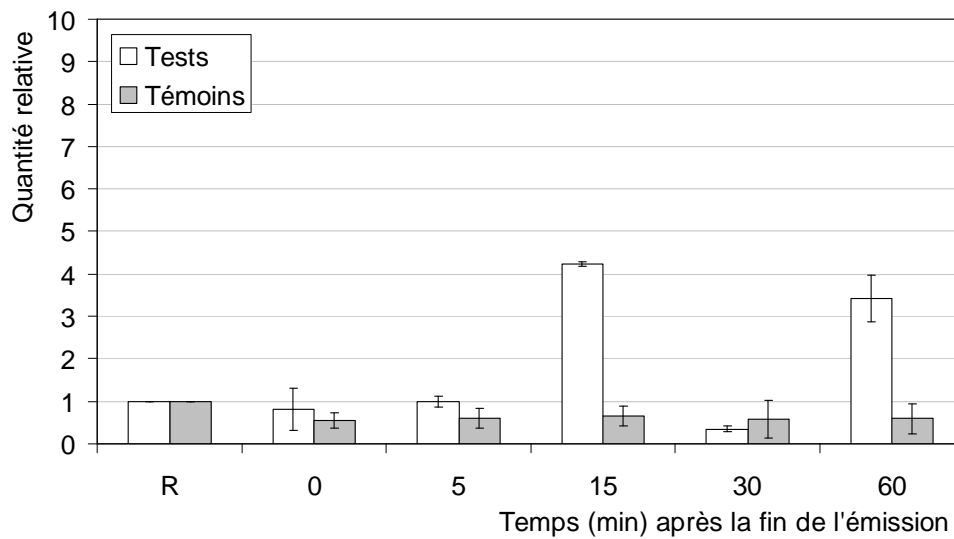


Figure 23 : abondance relative moyenne des ARNm « *proteinase inhibitor II* » (*pin2*) après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min) en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm erreur standard ($n = 3$ à 5). *R* représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement.

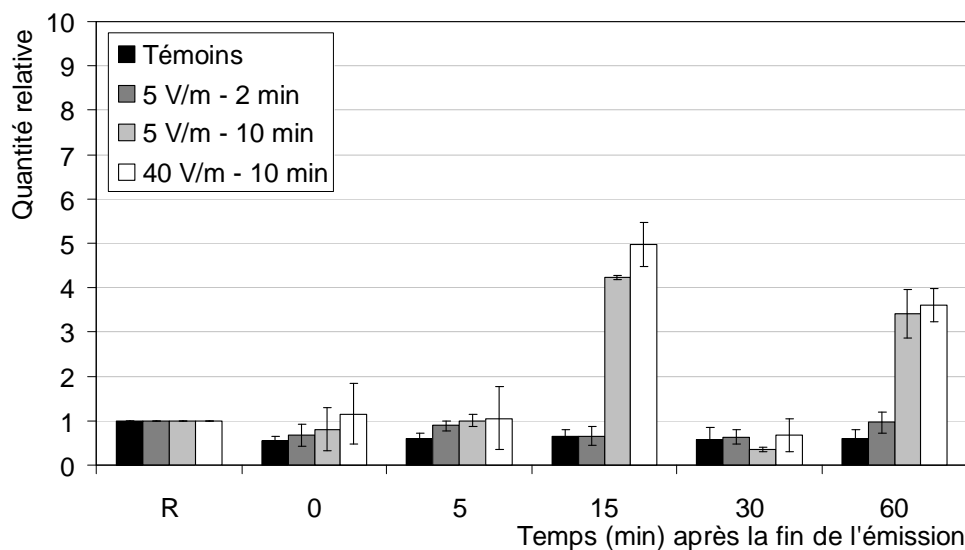


Figure 24 : modifications du traitement électromagnétique. Abondance relative moyenne des ARNm « *proteinase inhibitor II* » (*pin2*) après émission du CEM (900 MHz) pour différentes durées et amplitudes du champ. Valeurs moyennes \pm erreur standard ($n = 3$ à 5). *Témoins* : plantes cultivées dans le caisson blindé, opaque au CEM. *R* représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement.

Nous avons ensuite testé le facteur de transcription (marqueur *lebzip1*, Figure 25) : l'application du CEM a pour conséquence une accumulation progressive et très marquée des ARNm sur les 15 premières minutes : 1,7 - 2,9 et 5,5 fois la valeur de référence. 30 minutes après le traitement, nous observons une baisse de cette quantité au niveau de la valeur témoin. Bien que plus faible qu'au point 15 min, un dernier pic significatif d'accumulation apparaît au temps 60 min, (4,5 fois la valeur référence).

Le marqueur étudié ensuite est le facteur de maturation d'ARNm « *cmbp* » (Figure 26), des accumulations significativement différentes des valeurs témoins sont observées aux points 0, 15 et 60 minutes après traitement (respectivement 3,1 ; 6,6 et 5 fois la valeur de référence), alors que des valeurs semblables aux valeurs témoins sont mesurées 5 et 30 minutes après le traitement.

Nous nous sommes finalement intéressés à la calmoduline ainsi qu'aux protéines kinases dépendantes du calcium, marqueurs qui interviennent dans les étapes précoces de la signalisation cellulaire. L'exposition des plantes au CEM conduit à une augmentation progressive de l'accumulation des ARNm « *calm-n6* » pendant les 15 premières minutes suivant la fin de l'émission (Figure 27, temps 0, 5 et 15 min) : immédiatement après l'arrêt du CEM nous observons que la quantité relative d'ARNm test dépasse en moyenne de 1,8 fois la quantité de référence. Cette différence se retrouve significativement 15 minutes plus tard avec une augmentation de 5,5 fois la référence. Cette accumulation d'ARNm est transitoire, car trente minutes après le traitement, la quantité relative d'ARNm n'est pas significativement différente de la valeur des plantes témoins. Enfin, nous observons une seconde accumulation significative des ARNm 60 minutes après le traitement (point 60), avec une hausse de 5,3 fois la valeur de référence.

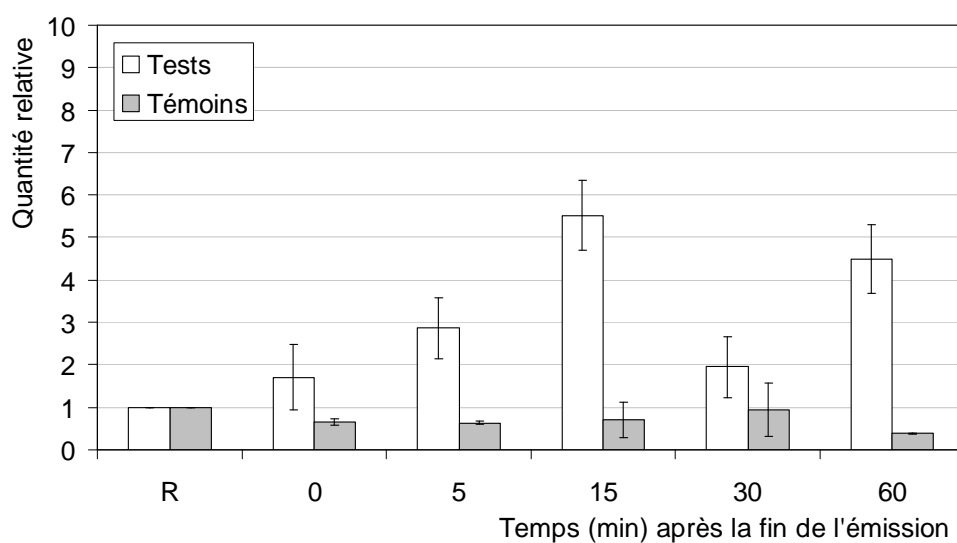


Figure 25 : *abondance relative moyenne des ARNm « Lycopersicon esculentum bZIP 1 » (lebzip1) après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min) en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm erreur standard (n = 3 à 5). R représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement.*

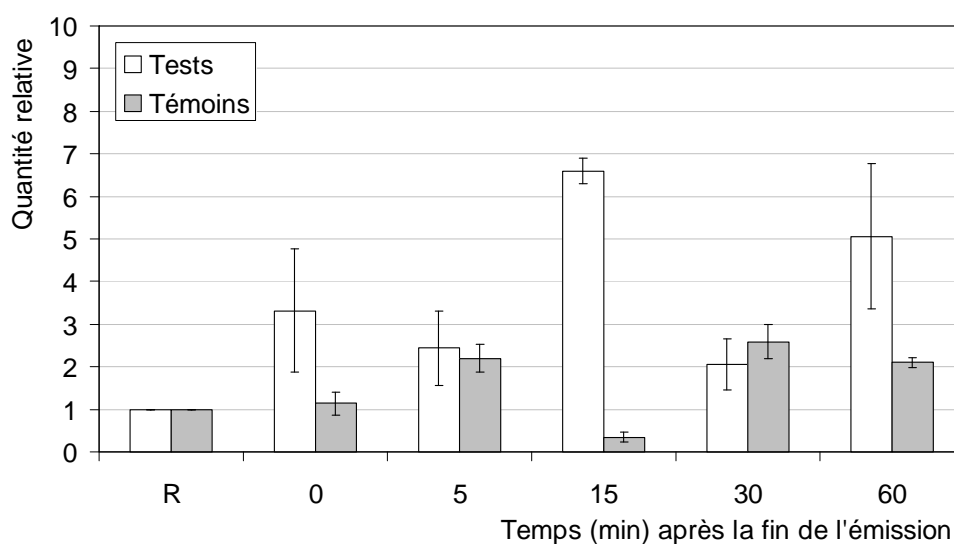


Figure 26 : *abondance relative moyenne des ARNm « Chloroplaste-mRNA-binding-Protein » (cmbp) après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min) en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm erreur standard (n = 3 à 5). R représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement.*

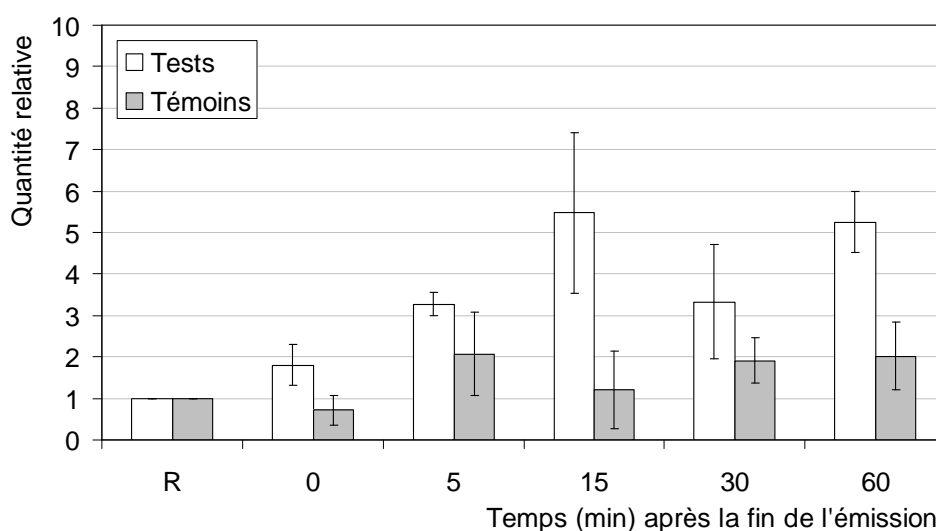


Figure 27 : abondance relative moyenne des ARNm « calmoduline-n6 » (*calm-n6*) après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min) en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm erreur standard ($n = 3$ à 5). R représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement.

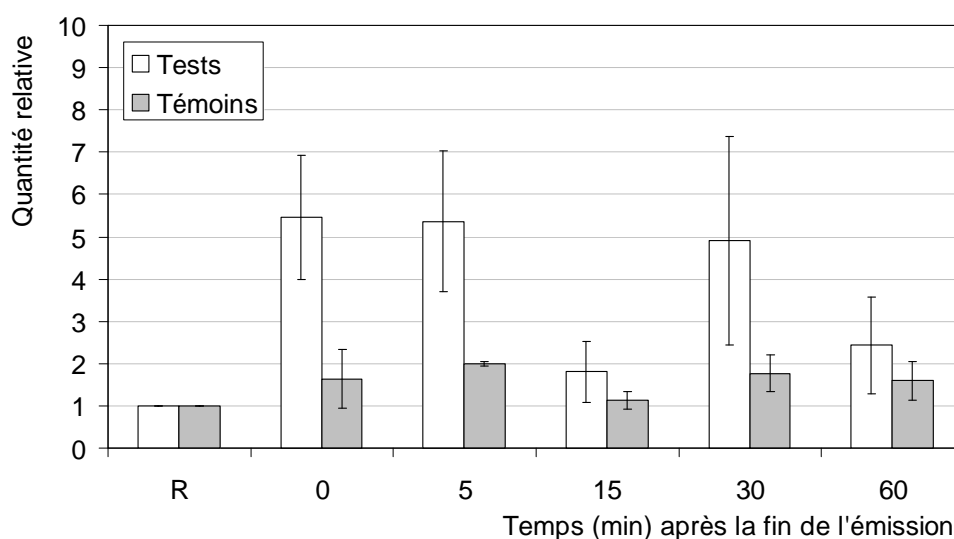


Figure 28 : abondance relative moyenne des ARNm « *Lycopersicon esculentum* calcium dependent protein kinase » (*lecdpk1*) après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min) en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm erreur standard ($n = 3$ à 5). R représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement.

Le profil d'accumulation des ARNm « lecdpk1 » (Figure 28) suit les mêmes variations que les ARNm calm-n6 mais d'une manière plus précoce : une accumulation très importante des ARNm est observée dès la fin du traitement (5,5 et 5,4 fois les valeurs de référence pour les points 0 et 5 minutes). Ici aussi cette augmentation est transitoire car au point 15 minutes, la valeur expérimentale recoupe la valeur témoin. Cependant, nous observons à nouveau un pic d'accumulation important (4,9 fois) 30 minutes après la stimulation puis un retour aux valeurs témoins après 60 minutes.

L'ensemble des analyses de PCR quantitative a utilisé les ARNm de l'actine comme référence interne. La Figure 29 illustre la stabilité de l'ARNm « actin » au cours de l'étude et représente une justification de son utilisation comme référence pour la RTqPCR. Au cours de la récolte, les quantités d'ARNm « actin » oscillent entre 0,8 et 1,2 autour de la valeur de référence (R, plantes récoltées avant le traitement). Ces données représentent la variabilité inhérente aux différents protocoles expérimentaux qui conduisent à la préparation de la RTqPCR ainsi qu'aux variations biologiques plante à plante.

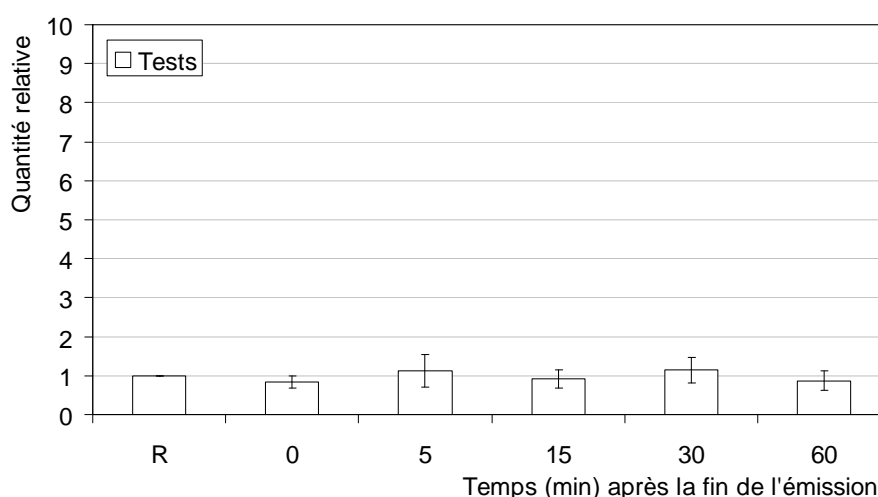


Figure 29 : abondance relative moyenne des ARNm « actin isoforme B » (actin) après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min) en fonction du temps. Valeurs moyennes ± erreur standard (n = 3 à 5). Plantes cultivées dans le caisson perméable au CEM. R représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement.

3. Effets de la modulation du calcium

Les résultats précédents concernant les transcrits des protéines affines du calcium nous ont amené à évaluer le rôle de cet ion dans la réponse des plantes au CEM HF. Le calcium joue un rôle central dans le métabolisme cellulaire et comme messenger secondaire des cascades de transduction (Sathyanarayanan et Poovaiah, 2004 ; Medvedev, 2005 ; Ray *et al.*, 2007). Nous avons choisi de faire varier la concentration en calcium dans le milieu de culture en augmentant ou en diminuant sa concentration et en utilisant des agents chélateurs du calcium, ou bloquant les canaux calciques membranaires (Tableau 3). Nous avons alors mesuré les variations survenant rapidement (5 et 15 minutes après le traitement) de l'abondance de trois des ARNm étudiés précédemment, en réponse à l'exposition au CEM.

La Figure 30 (a) montre que lorsque les plantes sont cultivées sur le milieu de culture standard (0,73 mM de calcium), une accumulation importante et rapide des transcrits calm-n6 et lecdpk1 intervient 15 minutes après la fin du traitement (5,5; 5,3 respectivement) alors que le marqueur pin2 présente une augmentation moins importante (3,6 fois). Seul le transcrit calm-n6 s'accumule d'une manière importante (3,2 fois) et précocement au temps 5 minutes. Nous retrouvons ici les résultats antérieurs à l'exception du marqueur lecdpk1 qui présente un décalage de 10 min par rapport à la réponse observée Figure 28, temps 15 min. Ce décalage peut être attribué à la variabilité naturelle entre les lots de plantes différents.

(mM)	Standard	+ Calcium	- Calcium	- Calcium + EGTA	- Calcium + BAPTA	- Calcium + LaCl ₃
[Calcium]	0,73	7,3	0	0	0	0
[Agents]	-	-	-	0,5	0,4	0,1

Tableau 3 : composition des milieux de culture modifiés (sont indiquées les concentrations ajoutées dans les milieux).

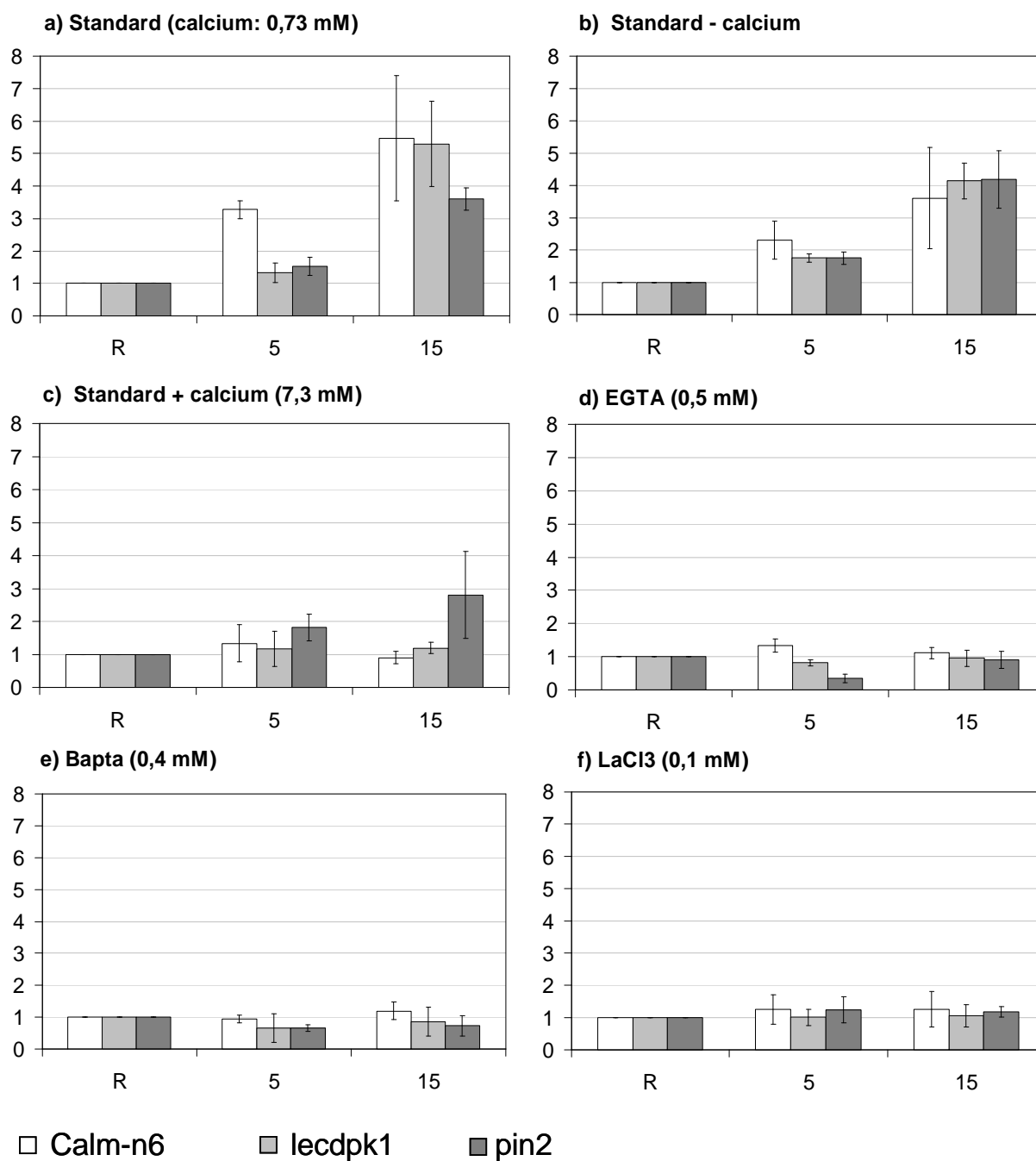


Figure 30 : variation de la concentration en calcium, effets sur l'abondance relative des ARNm en réponse au CEM. Abondance relative moyenne des ARNm (pour trois gènes cibles et pour six milieux de culture différents) après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min), en fonction du temps (5 min ; 15 min). Valeurs moyennes \pm erreur standard (n = 3). R représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement.

Les plantes cultivées sur un milieu sans ajout de calcium Figure 30 (b) donnent lieu à des réponses très similaires puisque les trois transcrits considérés s'accumulent de manière importante 15 minutes après le traitement (3,6 ; 4,1 et 4,2 fois respectivement). Cependant les transcrits liés au calcium (calm-n6 et lecdpk1) montrent une accumulation moindre en comparaison du milieu standard. Au temps 5 minutes, l'ARNm calm-n6 montre encore l'accumulation la plus importante (2,3 fois).

Sur un milieu de culture contenant 10 fois la concentration standard en calcium (7,3mM), aucune variation de l'abondance des marqueurs calm-n6 et lecdpk1 n'est observée Figure 30 (c). En revanche, le marqueur pin2 montre une légère augmentation 5 minutes après le traitement (1,8 fois) et une plus forte au temps 15 minutes (2,8 fois).

Enfin, sur les milieux sans calcium, dans lesquels nous avons ajouté des agents chélateurs (EGTA, Figure 30 (d) ; BAPTA, (e)) ou un agent bloquant les canaux calciques membranaires (LaCl_3 , (f)), nous n'observons aucune accumulation pour aucun transcrit. Au contraire, et concernant le marqueur pin2, celui-ci est significativement réprimé au temps 5 minutes en présence d'EGTA (d) et en présence de BAPTA (e), -70 % et -40 % respectivement.

4. Devenir des ARNm cibles sous influence du CEM HF

Nous avons étudié le devenir des ARNm décrits précédemment par l'extraction et le dosage en PCR quantitative des ARNm polysomiques. Dans ce cas, le traitement des plantes puis des ARNm est rigoureusement le même qu'aux paragraphes précédents à la seule différence que les ARN sont préparés à partir de polysomes séparés par ultracentrifugation (cf. Matériel et Méthodes).

Compte tenu de leurs rôles potentiels dans les cascades de transduction cellulaires et de leur côté ubiquitaire, nous avons choisi d'étudier ici trois des cinq marqueurs : calm-n6 (calmoduline), lecdpk1 (kinase) et pin2 (inhibiteur de protéase).

La Figure 31 montre les variations d'abondance des trois transcrits associés aux ribosomes. Il apparaît qu'ils ne s'accumulent pas dans le groupe d'ARN polysomiques de manière importante que 60 minutes après la fin du traitement (respectivement 6,8 ; 5,7 et 4,0 fois). De plus, pour *lecdpk1* et *pin2*, cette accumulation est progressive en moyenne, bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre les plantes traitées et les témoins (b) avant le temps 60 minutes.

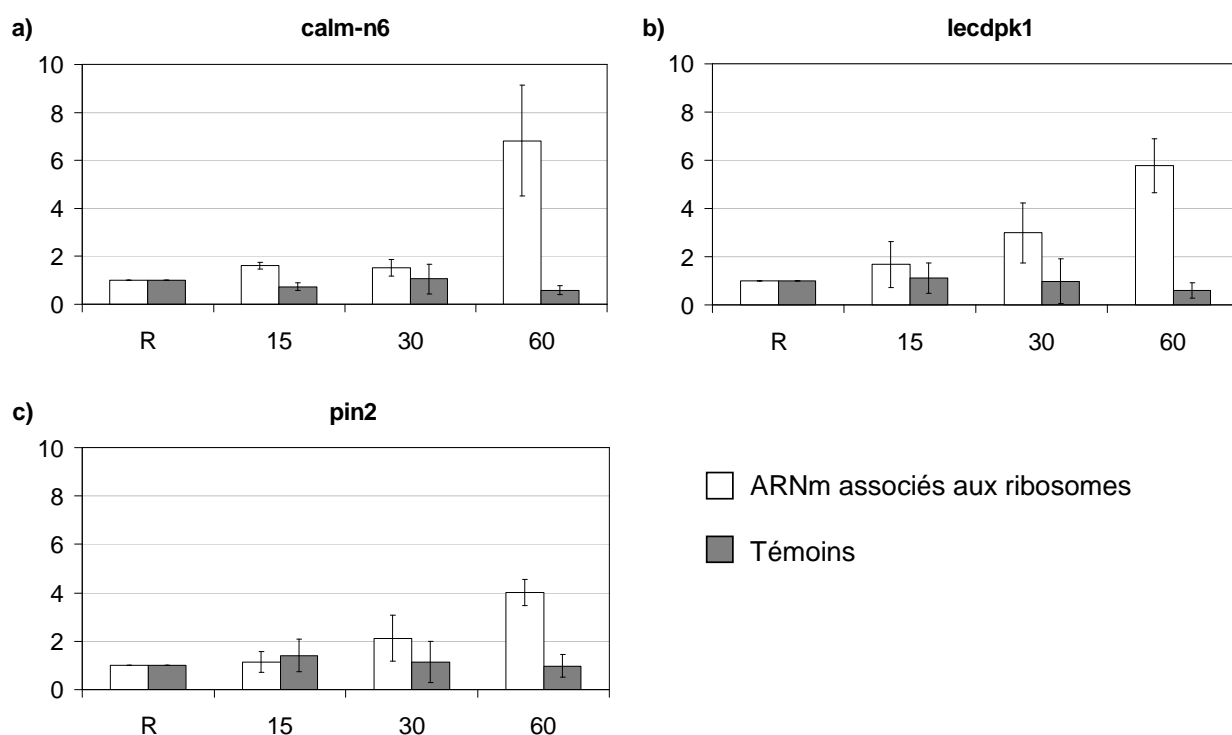


Figure 31 : prise en charge des ARNm. Abondance relative moyenne des ARNm associés aux polysomes pour trois gènes cibles, après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min) en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm erreur standard ($n = 3$). R représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement.

5. Effet du CEM HF sur l'état énergétique cellulaire

De manière à évaluer globalement le degré selon lequel la cellule est affectée par le CEM HF et corréler ceci aux événements moléculaires observés jusqu'à maintenant (accumulation de transcrits), nous nous sommes intéressés à l'état énergétique cellulaire en terme de concentration en ATP et de Charge Energétique Adénylique (CEA).

Le dosage de l'ATP montre que sa concentration cellulaire oscille en temps normal entre 11,9 et 14,7 pmol.mg⁻¹ de protéine (Figure 32, Témoins) au sein des caissons de culture. Trente minutes après la fin du traitement EM, nous observons une forte baisse de cette concentration (-40 % par rapport à la valeur témoin) qui reste importante au temps 60 minutes (-37 %). Aucune variation significative n'est notée plus précocement.

Nous observons également que la concentration totale en nucléotides adényliques (somme des nucléotides ATP + ADP + AMP) reste stable au cours du temps (Figure 33) puisque aucune différence significative n'est observée comparativement aux témoins.

La charge énergétique adénylique (CEA), définie par Atkinson (1968), est un marqueur de l'état général des cellules. Une variation de ce paramètre sensible traduit une modification plus ou moins profonde du métabolisme énergétique. Nous avons calculé les variations de la CEA des échantillons, au cours de l'heure suivant le traitement électromagnétique des plantes ($CEA = (ATP + \frac{1}{2} ADP) / (ATP + ADP + AMP)$).

Les mesures fournissent des valeurs typiques (tissus en croissance, physiologiquement actifs) pour les plantes témoins (protégées du CEM) : CEA de 0,84 en moyenne (Figure 34, Témoins).

Pour les échantillons tests la CEA est affectée significativement 30 minutes après la fin de l'exposition des plantes : nous observons une CEA de 0,68, soit une diminution importante de 18 % par rapport au témoin. De plus, cette baisse de la charge énergétique tend à s'amplifier 30 minutes plus tard : - 27 % au temps 60 minutes (CEA de 0,63).

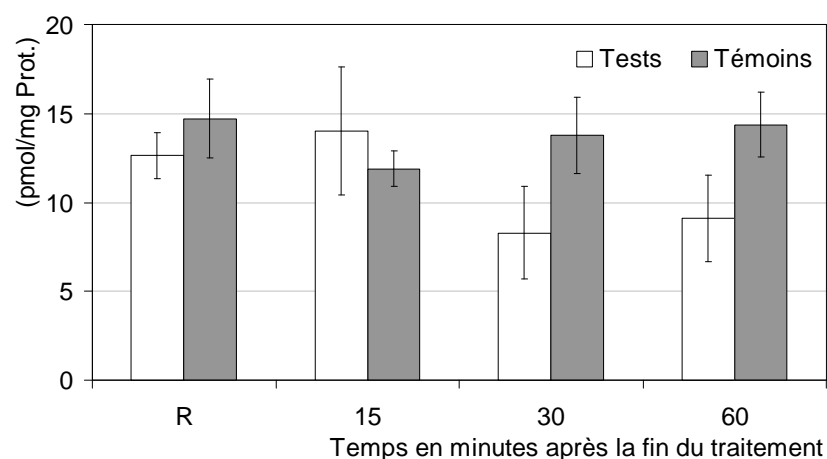


Figure 32 : évolution de la concentration en ATP au cours du temps après traitement électromagnétique des plantes. ATP dosé par luminescence (luciférine – luciférase). Echantillons récoltés après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min), en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm erreur standard (n = 3). R représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement.

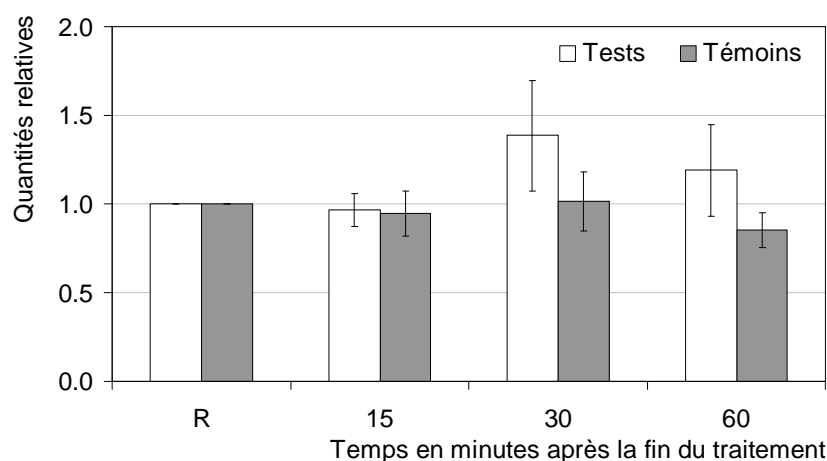


Figure 33 : évolution de la concentration relative en nucléotides adényliques (ATP + ADP + AMP) au cours du temps après traitement électromagnétique des plantes. Echantillons récoltés après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min), en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm erreur standard (n = 3). R représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement.

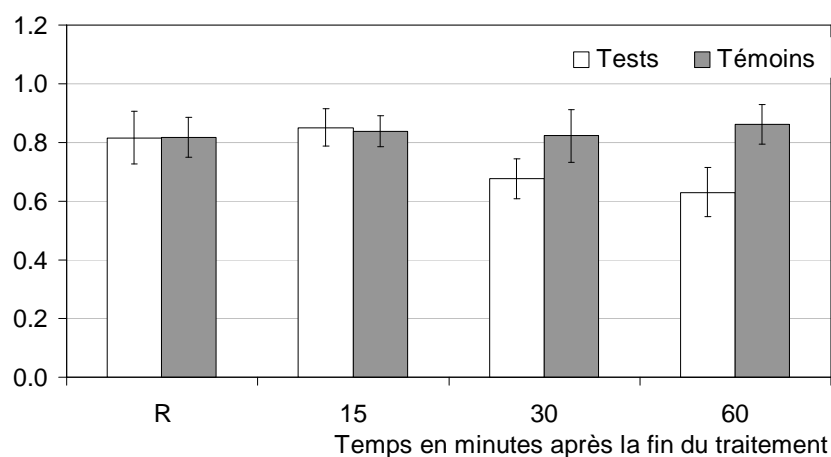


Figure 34 : évolution de la Charge Énergétique Adénylique (CEA) au cours du temps après traitement électromagnétique des plantes. Echantillons récoltés après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min), en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm erreur standard (n = 3). Unité arbitraire. R représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement.

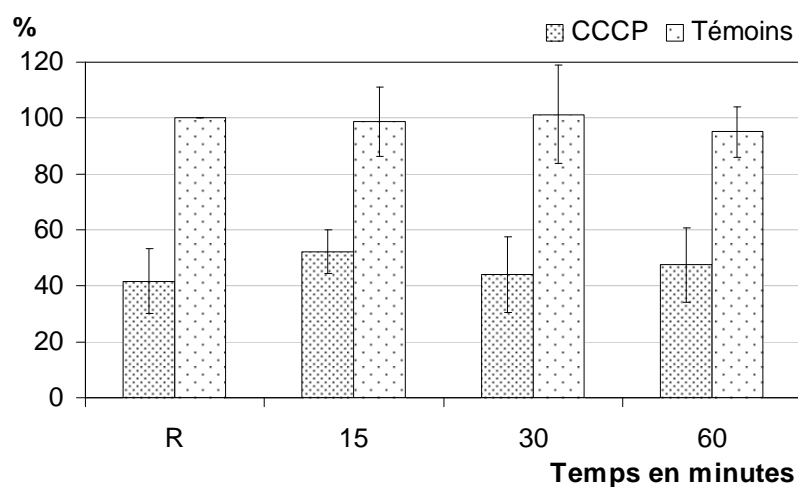


Figure 35 : effet du CCCP sur la concentration en ATP. 200 μ M de CCCP ont été ajoutés dans le milieu de culture 90 minutes avant le prélèvement des échantillons. Les concentrations des échantillons témoins sont exprimées en pourcentage de la valeur de référence (R) et en pourcentage des valeurs témoins pour les échantillons traités (CCCP), en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm erreur standard (n = 3).

De manière à confirmer l'existence d'un lien entre les réponses moléculaires que nous avons observées et le statut énergétique, nous avons finalement utilisé le protonophore CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) qui est un agent découplant des chaînes de transfert d'électron et par conséquent un inhibiteur de la synthèse d'ATP (Heytler, 1963).

Nous avons parallèlement évalué l'effet du CCCP sur la concentration en ATP de lots de plantes non exposés au CEM (Figure 35) : en présence de 200 μM de CCCP (ajouté au milieu de culture 90 minutes avant le prélèvement du premier échantillon « R »), la concentration en ATP des plantes traitées diminue en moyenne de 54 %.

La Figure 36 montre que l'ajout de 200 μM de CCCP dans le milieu de culture, 90 minutes avant l'exposition des plantes au CEM, inhibe les accumulations d'ARNm induites par le CEM (cf. § Résultats 2). Chacun des marqueurs (Figure 36 - a, b et c) montre des variations d'abondance d'ARNm statistiquement identiques aux valeurs témoins (plantes protégées du CEM).

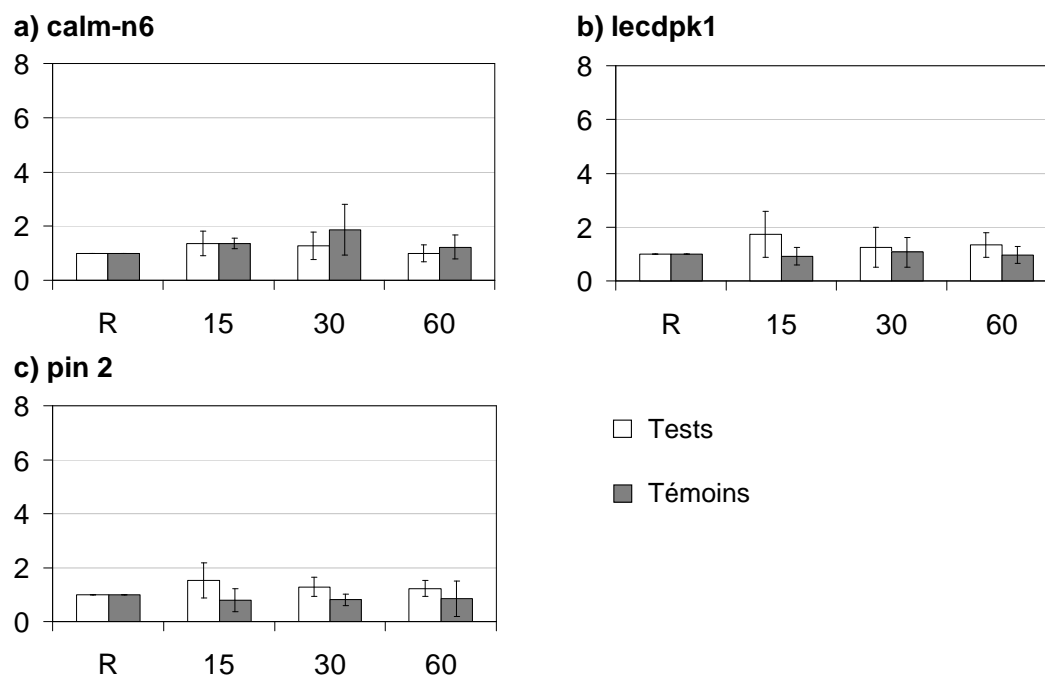


Figure 36 : effets d'un découplant sur les réponses moléculaires observées. Abondance relative moyenne des ARNm pour trois gènes cibles, après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min) en fonction du temps, et en présence de 200 μ M de CCCP dans le milieu de culture. Valeurs moyennes \pm erreur standard ($n = 3$).

DISCUSSION ::

Notre objectif principal à travers ce travail a été d'évaluer l'effet de l'exposition d'un organisme vivant à un champ électromagnétique haute fréquence tel qu'il est possible d'en observer en milieu urbain. Ceci a été abordé en irradiant des lots de plants de tomate par un CEM de courte durée (2 à 10 min), de faible amplitude (5 à 40 V.m⁻¹) et dont la fréquence (cependant sans modulation) est très répandue pour les communications en téléphonie mobile (900 MHz). Nous nous sommes volontairement positionnés sous les limites d'exposition EM fixées par les normes internationales, dans des conditions d'effets non thermiques. Immédiatement après ce traitement nous avons mesuré les variations de divers marqueurs cellulaires tout en élargissant l'étude à la compréhension des mécanismes mis en jeux dans cette interaction.

1. Analogie CEM HF / stimulus environnemental

Le principal résultat obtenu au cours de ce travail est la démonstration d'un lien formel et non équivoque entre le traitement EM des plantes et les réponses moléculaires observées, ce qui amène en conclusion que le CEM HF est perçu par les plants de tomate comme un stimulus environnemental.

Un premier point nécessaire pour l'établissement de ce lien formel a été la réalisation de témoins parallèlement à chaque essai. Chaque expérience a été réalisée en double exemplaire, une partie des lots de plantes étant placée dans le caisson de culture spécialement équipé d'un blindage atténuant le CEM HF. Ces plants ont été exposés à un champ résiduel de $\pm 0,5 \text{ V.m}^{-1}$ (cf. § 2.2) qui s'est avéré être insuffisant pour initier une réponse cellulaire (nous n'avons jamais enregistré d'accumulation d'ARNm dans ces conditions). La mise en place d'un blindage suffisamment efficace pour l'un des deux caissons de culture a fait partie des prérequis importants : il nous a permis pour chaque expérience, de valider les résultats observés dans le caisson « non blindé ».

1.1. Abondances d'ARN messagers cibles

Immédiatement après exposition au CEM HF, l'abondance de chacun des marqueurs (ARNm) augmente de manière rapide (première accumulation 15 minutes après le traitement) et importante (jusqu'à 6,5 fois la valeur de référence avant traitement). En parallèle, les plantes disposées dans le caisson blindé ne montrent aucune accumulation significative (cf. § Résultats 2).

Nous avons choisi l'ARNm de l'actine pour normaliser les données (cf. Matériel et Méthodes § 5.2) car il code pour une protéine de structure du cytosquelette universelle présente en grande quantité, et dont les variations éventuelles de l'abondance du transcrit sont de ce fait très faibles, compte tenu de la courte durée des expériences. Ce marqueur est parmi les plus utilisés comme référence, de même manière que la Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD) ou les protéines ribosomales (Suzuki *et al.*, 2002). Chez la tomate, son abondance n'est pas influencée par l'exposition EM (Figure 29).

L'évolution de l'abondance de quatre transcrits (*calm-n6*, *cmbp*, *lebzip1* et *pin2*) sur un même graphique permet de souligner la tendance générale de leur variation : un profil triphasique typique de situation de stress (Davies *et al.*, 1997 ; Vian *et al.*, 1999 ; Vian *et al.*, 2006 ; Beaubois *et al.*, 2007). Le calcul, à titre indicatif, de la moyenne des quatre profils (*calm-n6*, *cmbp*, *lebzip1* et *pin2*) permet de préciser ce motif (Figure 37, en rouge). En moyenne, la première accumulation est progressive et sensible dès la fin du traitement EM (0 min) pour atteindre son maximum après 15 min. Nous observons ensuite une baisse prononcée (- 50 %) 15 min plus tard (point 30 min) suivie d'une nouvelle accumulation presque aussi importante que la première, à 60 minutes.

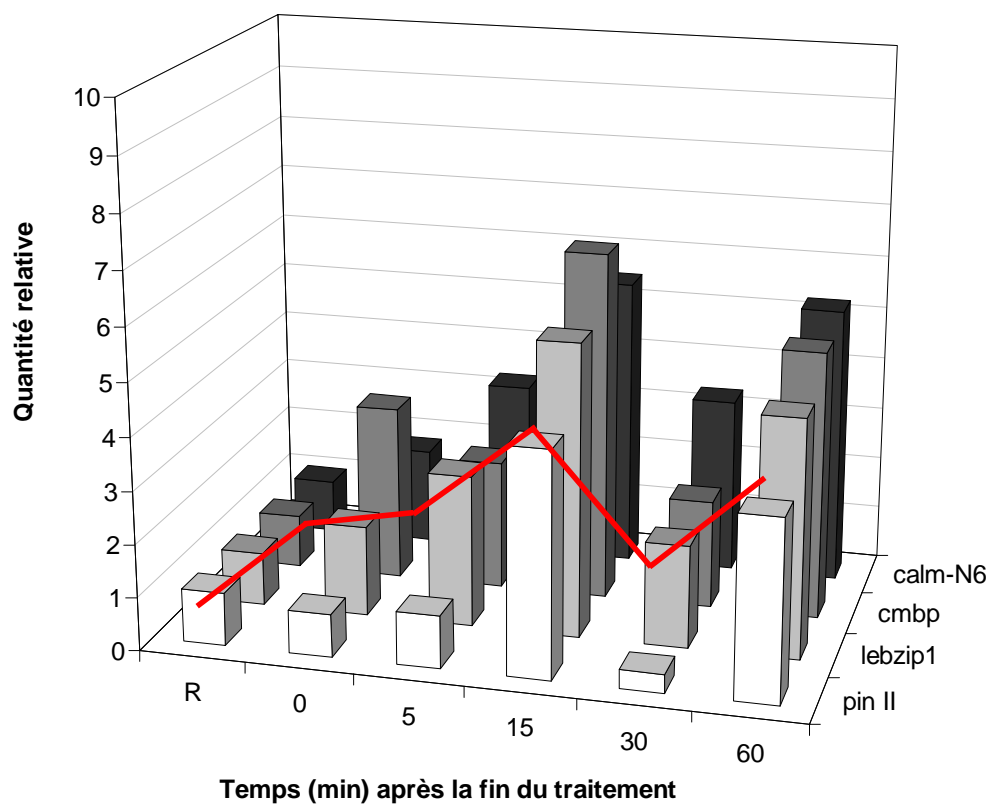


Figure 37 : *abondance relative moyenne de quatre ARNm après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min) en fonction du temps. R représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement. A titre indicatif, la moyenne de l'abondance des quatre marqueurs est représentée en rouge.*

Enfin, il apparaît globalement que toutes les variations observées sont significativement différentes des valeurs de référence (R). Et nous avons vu qu'aucune accumulation significative n'est observée en présence du blindage. Ceci nous permet de corréler le CEM aux effets observés.

Nous n'avons pas inclus le marqueur *lecdpk1* dans cette analyse car il présente un profil d'accumulation légèrement décalé dans le temps (Figure 28) : deux accumulations importantes (à 0 – 5 min et 30 min après traitement EM) séparées par un retour à des valeurs proches de la normale (temps 15 min). Si nous faisons abstraction de ce décalage, le profil observé pour ce transcrit est tout à fait semblable à l'allure générale. Des profils d'abondance similaires (triphasiques) ont été décrits par plusieurs auteurs à la suite de traitements lésants (brûlures, piqûres des feuilles ou stimulations électriques) de plantes (Zhang *et al.*, 2004 ; Peña-Cortès *et al.*, 1995) et notamment pour les marqueurs *pin2* (Stankovic et Davies, 1996 - 1997), *cmbp* (Vian *et al.*, 1999) et *lebzip1* (Stankovic *et al.*, 2000).

Des travaux récents de notre équipe (Beaubois *et al.*, 2007) ont montré que de jeunes plants de tomate, dont une seule feuille est exposée au CEM HF, expriment rapidement une réponse moléculaire à distance, dans la feuille terminale protégée du champ. Cette réponse dépend fortement de la présence d'hormones (acide jasmonique, acide abscissique). En d'autres termes, le CEM HF est capable d'induire une réponse de type systémique chez la tomate, ce qui est caractéristique d'une réponse à un stress environnemental lésant (Vian *et al.*, 1996 ; Bowles, 1998).

Ces premiers résultats permettent de répondre à la question suivante : est-il possible de considérer le CEM comme un stimulus environnemental ? Le traitement EM génère chez la tomate une réponse cellulaire semblable à ce qui est observé après blessure, et de surcroît sans laisser apparaître des signes externes de son action. Cela démontre l'existence d'une analogie entre la perception de stress et celle du CEM par la plante.

Les marqueurs étudiés codent pour des protéines qui interviennent à différentes étapes de la transduction des stress cellulaires : par exemple, le marqueur calmoduline, principal récepteur du calcium (lui-même messenger secondaire), joue un rôle important dans les étapes précoces de la réponse cellulaire (Yang et Poovaiah, 2003) alors que les marqueurs *cmbp* et *pin2* (clonés après des brûlures et blessures de feuilles) interviennent plus en aval dans la maturation d'autres ARN et comme gène effecteur (Pearce *et al.*, 1991). Tous les marqueurs montrent des réponses significatives et quasi-semblables en amplitude et en chronologie malgré les différences qui existent entre leurs rôles respectifs. Cette observation indique clairement l'existence d'un lien direct de cause à effet entre la perception du CEM par les plantes et les réponses observées et nous permet de supposer qu'il existe un mécanisme général et/ou un signal primaire régissant le comportement de ces marqueurs suite au traitement EM.

La tomate répond typiquement aux stimuli environnementaux par l'accumulation de transcrits liés au stress et selon une réponse triphasique : i) accumulation rapide et transitoire d'ARNm, ii) une phase de faible abondance, iii) une seconde phase d'accumulation souvent moins importante que la première. (Vian *et al.*, 1999).

Il convient d'être prudent sur l'interprétation de l'accumulation des transcrits car l'abondance observée dépend finalement de l'équilibre entre le taux de synthèse et de dégradation. Une augmentation de l'abondance d'un transcrit peut être due à une baisse de sa dégradation ou à l'augmentation de sa transcription. Néanmoins, le profil triphasique régulièrement observé peut s'expliquer par une activité suffisamment importante de la transcription lors de la première et dernière phase pour couvrir les activités de dégradation des ARNm. Alors que ces dernières prennent le dessus sur la synthèse lors de la 2^{ème} phase ce qui se traduit par une baisse de l'abondance des ARNm. Cette période intermédiaire de faible quantité d'ARNm correspondrait soit à un arrêt de la transcription (dans ce cas, la demi-vie des ARNm intervient) soit à une dégradation active des ARNm.

L'activité des RNases augmente après des traitements lésants. En effet, des auteurs ont montré que les activités des RNases et Nucléases pouvaient être induites par une blessure localement et de manière systémique (Lebrasseur *et al.*, 2002).

D'autre part, une hypothèse séduisante consiste à considérer les deux accumulations successives d'ARNm comme deux groupes distincts :

- le premier étant une production réflexe massive d'ARNm destinée à surcharger la machinerie de transcription cellulaire de manière à défavoriser l'éventuelle synthèse d'ARNm viraux dans le cas où le stimulus perçu serait dû à une attaque virale (Davies et Stankovic, 2006), fréquemment rencontrée après blessure par des insectes (Reymond *et al.*, 2000). Ces ARNm n'ont donc pas pour vocation d'être traduits, d'autant plus qu'étant produits rapidement et en grande quantité, ils contiennent de nombreuses erreurs de codage.

- le deuxième groupe d'ARNm, plus tardif, serait destiné à la production de protéines fonctionnelles et revêtirait donc une valeur physiologique axée vers la protection de la cellule et/ou vers la régulation de telle ou telle voie métabolique (León *et al.*, 2001).

Les expériences concernant les ARN polysomiques ainsi que l'état énergétique cellulaire apportent quelques arguments en faveur de cette dernière hypothèse (cf. § suivant).

Il est également possible qu'un mécanisme différent régie chacune des réponses triphasiques que nous observons (Davies et Stankovic, 2006). Trois signaux distincts pourraient intervenir, le premier initiant la synthèse immédiate de transcrits dépourvus de rôle physiologique. Le deuxième signal commanderait la dégradation de ces premiers transcrits, et enfin un troisième signal permettrait la synthèse finale des ARNm à destination des polysomes pour permettre la synthèse de protéines adaptées au contexte du stress.

1.2. Devenir des ARNm

Nous avons montré une analogie entre le CEM et un stimulus environnemental par la similitude de leurs effets sur l'abondance d'ARN messagers mais aucune donnée formelle sur leur devenir n'a cependant été apportée. La bibliographie rapporte fréquemment des accumulations d'ARNm liés au stress qui aboutissent à des fonctions cellulaires, cependant une augmentation d'ARNm n'est pas systématiquement associée avec une augmentation de la protéine correspondante (Harper, 2001).

Nous avons choisi de nous intéresser à l'étude des ARNm associés aux polyribosomes en profitant de l'outil rapide et précis développé précédemment : nous avons préféré la PCR quantitative aux techniques de type « western » car nous voulions suivre le devenir des transcrits ciblés. De plus, les calciprotéines (calmoduline et CDPK) appartiennent à des familles protéiques très conservées ce qui peut poser problème pour des protocoles « immunoblot » basés sur des anticorps (reconnaissance d'épitopes communs).

L'observation de trois marqueurs (calm-n6 ; lecdpk1 et pin2) montre que les ARNm ne sont pris en charge par les ribosomes que tardivement, 60 min après la fin du traitement EM (Figure 38 – b), en comparaison avec les ARNm libres (a). Pour le cas précis du transcrit lecdp1, la prise en charge est progressive car nous observons une légère accumulation significative dès le temps 30 min. Ceci est en accord avec le fait que ce marqueur présente un profil plus précoce d'accumulation des ARNm (pic d'abondance maximum de l'ARNm libre au temps 30 min). Mais quel que soit le marqueur considéré, il n'y a pas de baisse observée à 30 minutes pour les ARNm polysomiques.

La comparaison des profils moyens d'accumulation selon les groupes (Figure 38 – a et b) montre qu'il existe globalement une continuité chronologique entre l'accumulation des ARNm et leur prise en charge par les ribosomes. Bien qu'une étude approfondie de suivi des marqueurs soit nécessaire pour l'affirmer, il semble que seuls les transcrits les plus tardifs (ceux qui s'accumulent au temps 30 min pour lecdpk1 et 60 min pour calm-n6 et pin2) donnent lieu à une association avec les ribosomes.

La machinerie de traduction différencie les deux populations (précoce et tardive représentées par les ARNm libres), donc l'association des ARNm avec les ribosomes ne se fait pas systématiquement.

Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle, en réponse à un stress, seule la deuxième vague d'ARNm donne lieu à une production de protéines donc à une fonction biologique. L'association des ARNm aux polysomes (et leur traduction consécutive) n'est pas une conséquence immédiate de la transcription (Davies et Larkins, 1980). En effet, dans le groupe des ARNm totaux, l'abondance est maximale 30 min avant que l'accumulation soit détectée dans le groupe des ARNm associés aux polysomes. Le premier groupe contenant aussi le second, il est possible que le pic d'abondance observé au temps 60 min dans le groupe des ARN totaux soit en partie la conséquence de l'association des ARNm aux ribosomes.

Des situations similaires ont été décrites après des blessures légères sur des cotylédons de *Bidens pilosa*. où des variations dans la population d'ARNm polysomiques ont été enregistrées (Henry-Vian *et al.*, 1995).

Plus récemment, une étude sur des souches de cellules humaines a montré une augmentation de l'abondance de transcrits codant pour des protéines ribosomiques à la suite d'une stimulation EM typique de la téléphonie mobile (Remondini *et al.*, 2006). Les auteurs en déduisent une activation générale du métabolisme cellulaire. L'étude internationale REFLEX montre sur les cellules humaines que ce sont les expressions des gènes codant pour les protéines ribosomiques et pour le métabolisme énergétique qui sont le plus affectées par le CEM HF (REFLEX, 2004).

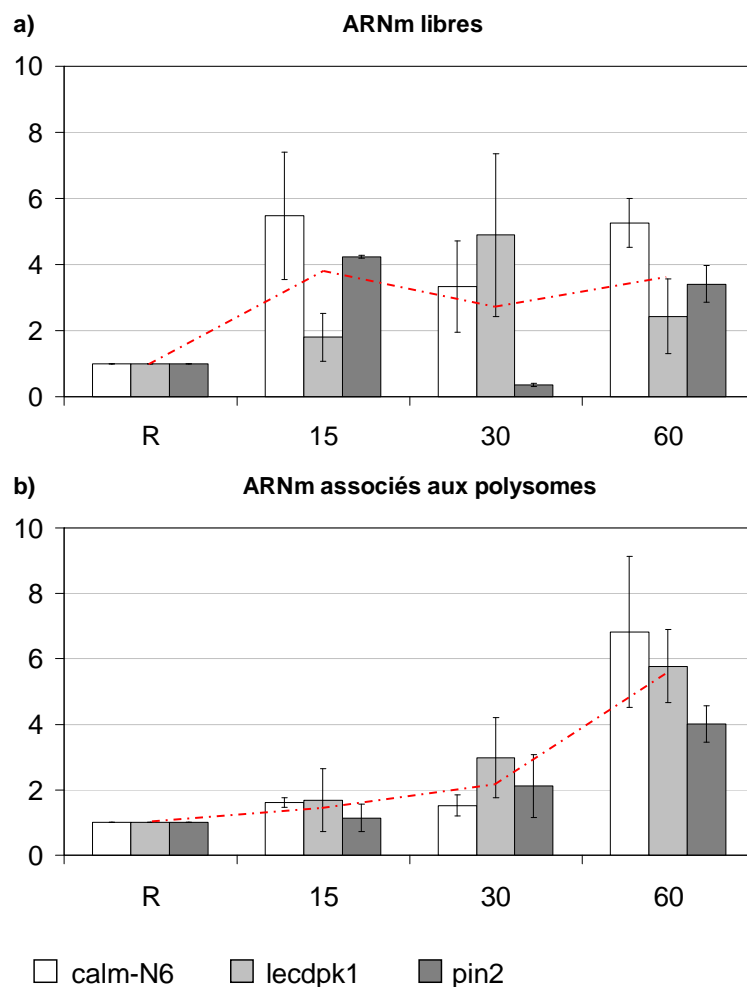


Figure 38 : comparaison des accumulations relatives de trois transcrits selon leur groupe de provenance après émission du CEM (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min) en fonction du temps, Valeurs moyennes \pm erreur standard (n = 3). R représente les plantes de référence non exposées, récoltées juste avant le traitement. **a) ARNm libres ; **b)** ARNm associés aux polysomes. A titre indicatif sont représentées les droites de tendance moyenne (pointillés) pour chaque groupe (libres / associés aux ribosomes).**

Il faut noter que les accumulations du groupe polysomique apparaissent plus importantes que celles du groupe d'ARNm totaux 60 minutes après la stimulation EM (Figure 38). Ces mesures sont improbables en théorie car les populations ont été extraites selon des protocoles différents et les ARNm polysomiques sont compris dans le groupe d'ARN totaux. De plus, il a été montré chez les Pois que moins de 40 % des ARNm sont généralement associés aux polysomes (Davies et Schuster, 1981). Simplement, l'approche en PCR quantitative relativise l'ensemble des données d'un lot d'échantillon par rapport au premier échantillon du lot. Il faut interpréter la figure en terme de facteur d'accumulation et se garder de comparer les quantités apparentes entre les ARN totaux et ceux associés aux ribosomes.

Nos données montrent que les ARN néo synthétisés tardivement (60 min) sont pris en charge par le système de traduction. Le CEM HF pourrait conduire à la production de protéines jouant un rôle dans les mécanismes de défense de la plante. Ces résultats apportent une nouvelle preuve suggérant que les plantes perçoivent le CEM HF comme un stimulus lésant.

Le mécanisme cellulaire induit par le CEM se constitue dans un premier temps d'une réponse triphasique d'ARNm et dans un deuxième temps d'une association de ceux-ci avec les ribosomes (dans le but de produire des protéines fonctionnelles), ce qui est une réaction typique des plantes à un stress environnemental.

1.3. Etat énergétique général

Le statut énergétique est affecté par le CEM HF. Cela se traduit par l'observation de deux paramètres liés : la baisse de la concentration en ATP et de la charge énergétique adénylique (CEA), 30 minutes après l'exposition au CEM (Figure 32 et Figure 34). Là aussi, il est possible de faire un parallèle entre les réponses aux blessures et au CEM HF, puisque des variations similaires de l'état énergétique ont été observées après des expériences de blessure chez la Bident (Henry-Vian *et al.*, 1996) et d'une manière générale après stress, typiquement lors de phénomènes d'anoxie (Blokhina *et al.*, 2003).

Dans un premier temps, la mesure de ces deux paramètres (ATP, CEA) permet d'évaluer la qualité des conditions de maintien des plantes. Pour les lots témoins (cultivés dans le caisson de culture équipé d'un blindage contre le passage du CEM), nous observons que la concentration en ATP reste stable au cours du temps et que la charge énergétique oscille entre 0,82 et 0,86 (valeur typique pour des plantes en croissance dans un état physiologique normal). La CEA est un indicateur de l'état énergétique global des cellules, des fluctuations importantes de ce paramètre traduisent directement des modifications du métabolisme cellulaire (Moal *et al.*, 1991 ; Atkinson, 1968). Ces premières observations démontrent que le protocole ainsi que les caissons de culture spécialement construits pour ce travail sont tout à fait adaptés à la culture des tomates.

Dans le caisson dépourvu de blindage, nous observons une baisse significative en ATP, 30 et 60 minutes après le traitement EM. Sous l'influence du champ, la production tout comme la consommation d'ATP peuvent être influencées, celui-ci jouant plusieurs rôles clés au sein de la cellule :

- les activités intenses de transcription et de traduction qui interviennent après la stimulation EM (accumulations d'ARNm libres et polysomiques) sont fortement consommatrices d'énergie.
- de l'ATP est immédiatement consommé par les ATPases qui se chargent d'entretenir et de rétablir les gradients de calcium entre les organites et le cytoplasme après le déclenchement des voies de signalisation cellulaires (Knight *et al.*, 1991).

- l'ATP est également consommé par de nombreux processus cellulaires (production de métabolites secondaires, rétablissement des gradients ioniques...) dès qu'un évènement « traumatisant » intervient (Dobrota, 2006).
- il est possible que la production d'ATP soit directement affectée, puisque les ATPases tout comme la chaîne respiratoire mitochondriale (recyclage des molécules énergétiques) peuvent être influencées par des CEM (Sanders *et al.*, 1984 ; Lacy Hulbert *et al.*, 1998 ; Kohane et Tiller, 2000).
- enfin, l'ATP lui-même est utilisé par les cellules comme médiateur du stress. Cette fonction, très décrite chez les animaux, est de plus en plus étudiée chez les plantes (Demidchik *et al.*, 2003 ; Roux et Steinebrunner, 2007) : de l'ATP serait excrété par les cellules dans l'apoplasme lors de la perception d'un stimulus et participerait à la propagation locale du signal et à l'entrée de calcium dans le cytoplasme. Cet ATP extracellulaire (ATPe) serait ensuite rapidement hydrolysé. Une partie de la consommation en ATP que nous observons peut être due à ce mécanisme très précoce de la transduction cellulaire mais il est nécessaire de pouvoir quantifier la sortie d'ATP pour pouvoir valider cette hypothèse.

Dans ces mêmes conditions, nous observons une baisse de 27 % de la CEA, 60 minutes après la fin de l'exposition au CEM HF. Or, pour tout organisme en condition physiologique normale, la CEA oscille usuellement entre 0,7 et 0,85. Lorsque le ratio descend sous le seuil de 0,7 cela traduit une perturbation globale du métabolisme, typiquement une réponse à un stress environnemental (Pradet, 1967 ; Sylvestre *et al.*, 1986). Le métabolisme énergétique des plants de tomate est donc influencé par l'action du CEM HF. Il est possible de déterminer dans quelle mesure, en étudiant les variations de la somme des nucléotides adényliques ($S = \text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}$).

Si cette valeur (S) diminue de manière importante au cours du traitement, cela indique que les cellules sont profondément affectées. A l'inverse, si le pool des nucléotides adényliques reste stable au cours du temps, cela traduit simplement une rapide réquisition de l'énergie par les cellules sans conséquence grave au niveau cellulaire, c'est cette situation qui est observée après exposition des plantes au CEM (Figure 33). Cela suggère que le champ n'est pas un stimulus « lésant » dans les conditions que nous avons choisies (fréquence, amplitude...).

Les premières modifications du métabolisme énergétique sont synchronisées avec les autres événements observés (abondances d'ARNm), elles interviennent dans les 15 - 30 minutes qui suivent le traitement EM (baisse d'ATP mesurée au point 30 min). Ce phénomène peut être la cause comme la conséquence de la réponse cellulaire. Consécutivement à la stimulation EM il se peut que les cellules entrent dans une activité intense mais transitoire. Ceci résulte finalement en une modification brève de la CEA sans conséquence profonde pour le métabolisme énergétique. Cependant, il apparaît que les réponses de la plante au traitement EM sont intimement liées à ce potentiel énergétique : en présence de CCCP, aucune accumulation typique d'ARNm n'est observée après émission du CEM (Figure 36). L'utilisation du protonophore CCCP conduit à une destruction du gradient de proton transmembranaire et indirectement à l'arrêt de la phosphorylation oxydative, c'est-à-dire la production d'énergie sous forme d'ATP par la cellule (Heytler, 1963). L'ajout de 200 μM de CCCP dans les milieux de culture conduit à une baisse moyenne de 54 % de la concentration en ATP (Figure 35) qui est suffisante pour inhiber la réponse cellulaire.

L'ensemble des réactions métaboliques (biochimiques) de la cellule sont sensibles au pH et les mécanismes de son maintien sont de grands consommateurs d'ATP (Gout *et al.*, 1992) : les flux de protons sont régis par l'action des ATPases membranaires et permettent la régulation (en plus du pH) des autres concentrations ioniques au sein des compartiments cellulaires (Colcombet *et al.*, 2005), notamment les gradients de calcium via des antiports $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ (Gilroy *et al.*, 1993).

De plus, la plupart des stimuli environnementaux (en particulier mécaniques), causent une baisse de pH cytoplasmique (Kurkdjian et Guern, 1989). Lors d'une diminution aussi importante de sa concentration, en présence de CCCP, l'ATP restant est probablement consommé en priorité pour le maintien des gradients de protons (pH) au dépend de la réponse cellulaire ce qui explique les résultats observés (absence d'accumulation de transcrits).

Une des hypothèses d'interaction du CEM HF avec la plante au niveau de la membrane plasmique implique l'existence d'un gradient électrique de part et d'autre de celle-ci. Il est possible que l'action du CCCP inhibe la réponse de la plante à son point de départ c'est-à-dire au niveau de la perception du signal, en détruisant les gradients ioniques transmembranaires. La dépendance énergétique observée peut aussi être due à l'absence de genèse du signal primaire (potentiel d'action et/ou variation de potentiel implicitement dépendants des gradients de protons) qui serait le médiateur de la transmission du stress localement et de manière systémique à travers la plante entière (Davies et Stankovic, 2006 ; Beaubois *et al.*, 2007).

Enfin, chacun des rôles secondaires de l'ATP peut être source de l'inhibition de la réponse cellulaire en cas de disparition : celui-ci est nécessaire pour entretenir les gradients de calcium (Ca^{2+} - ATPases), pour les synthèses d'ARNm et consécutivement des protéines et il est primordial dans le déclenchement des voies de signalisation (Kim *et al.*, 2006). L'ATP, en tant que médiateur extracellulaire du stress, est capable de réguler indirectement l'abondance de certains ARNm liés au stress via l'activation des voies de transduction liées au calcium (Jeter *et al.*, 2004).

L'ATP apparaît naturellement comme un point de convergence étant donné que toute activité cellulaire nécessite de l'énergie. L'ensemble de ces données renforce l'analogie entre la perception des blessures et du CEM HF par la plante et illustre notamment les relations complexes qui existent entre le métabolisme énergétique et les gradients ioniques.

2. Précision de l'interaction CEM HF / plante

2.1. Rôle de la température

L'influence de la température dans les phénomènes que nous observons doit être considérée avec d'autant plus d'attention que de nombreuses études évaluent le CEM en terme énergétique d'effet sur les tissus (DAS) et reportent des résultats concernant la famille des protéines HSP (Heat Shock Protein) typiquement sensibles à la température (Cotgreave, 2005), bien que répondant aussi à de nombreux autres stress abiotiques (Wang *et al.*, 2004). La notion de « chauffage athermique » a été proposée par plusieurs auteurs, elle résume bien la situation puisque les effets biologiques mesurés sous l'action du CEM HF de faible amplitude sont rarement corrélés à une hausse de température (Diem *et al.*, 2005). Dans nos conditions expérimentales, l'énergie distribuée est faible et correspond au plus à 0,1 W injectés dans un volume de 200 m³ ce qui est largement insuffisant pour générer des effets thermiques. Plusieurs études montrent par ailleurs que les puissances utilisées par les téléphones portables ne sont pas suffisantes pour conduire à des phénomènes de chauffage par induction (Blank et Goodman, 2004), de ionisation de molécules ou de génération de radicaux libres (Challis, 2005). Le fait que les réponses que nous observons ne soient pas dues à une modification de la température (Figure 22) soulève la question des mécanismes d'interaction entre le CEM HF et la plante, fréquemment nommés « effets athermiques », mécanismes qui sont physiquement très controversés (Adair, 2003).

2.2. Modifications du traitement EM (durée / amplitude)

De manière à approfondir la compréhension de la nature du signal et/ou du mécanisme impliqué dans la réponse des cellules au CEM HF, nous avons fait varier la durée et l'amplitude du traitement. Caractérisé lors de stress mécaniques sur la tomate (Green et Ryan, 1972 ; Zhang *et al.*, 2004), le marqueur pin2 a été choisi ici pour sa sensibilité et ses qualités de gène effecteur, en aval des voies de transduction cellulaires (marqueur de la réponse « finale » des plantes).

L'amplitude de 5 V.m⁻¹ représente l'émission moyenne d'un appareil GSM en communication alors que l'amplitude de 41 V.m⁻¹ correspond à la limite d'exposition de la population pour les stations relais, fixée par l'ICNIRP et adoptée par la Commission Européenne (ANFR, 2004).

D'une manière surprenante, nous n'avons pas observé de différence entre les réponses mesurées pour ces deux amplitudes de champ (Figure 24). Cependant, la réduction du temps de stimulation à 2 min, ainsi qu'une diminution de 87 % de l'amplitude (amplitude résiduelle de 0,5 V.m⁻¹ à l'intérieur de la chambre de culture opaque au CEM) suppriment les réponses. Il n'existe donc pas de rapport linéaire entre l'amplitude de la stimulation et l'amplitude des réponses de la plante.

En simplifiant l'interprétation des résultats, nous n'observons finalement une réponse moléculaire (augmentation de l'abondance de l'ARNm pin2) que pour les essais qui représentent le plus d'énergie (Tableau 4). L'hypothèse d'un mécanisme linéaire (dose – dépendant) est alors improbable, puisque apparaît l'existence d'un seuil de déclenchement de la réponse : les valeurs les plus faibles du traitement sont sans effet alors que les deux valeurs les plus fortes déclenchent des réponses semblables. Le CEM HF est donc perçu par les plantes via un mécanisme déclencheur de type « tout ou rien ». De tels mécanismes, caractéristiques de la génération de potentiels d'action, ont été étudiés récemment chez une algue, est sont associés aux mouvements de calcium cytoplasmiques en relation avec la lumière (Baudenbacher *et al.*, 2005).

Les signaux électriques (potentiels d'action, variations de potentiel) caractérisés par plusieurs auteurs (Bowles, 1995 ; Fisahn *et al.*, 2004 ; Davies, 2006), seraient utilisés chez les végétaux comme vecteurs de la transmission des messages de stress localement, ainsi qu'au sein de la plante entière (transmission systémique). Ces signaux électriques (Wildon *et al.*, 1992) ont été directement corrélés à l'accumulation de certains des marqueurs étudiés dans ce travail : notamment les transcrits *pin2* (Stankovic et Davies, 1996 ; Herde *et al.*, 1999), ceux de la calmoduline (Vian *et al.*, 1996) et le marqueur CMBP (Vian et Davies, 2006). Nos observations, bien qu'elles soulèvent l'hypothèse d'une réponse de type « tout ou rien », ne permettent pas de corréler l'action du CEM HF à la genèse de tels signaux car nous n'avons réalisé qu'une exposition globale des plantes au CEM. Cependant, un travail récent dans notre équipe (Beaubois *et al.*, 2007) montre, sur un même plant de tomate, que l'information de « stress » est rapidement transmise depuis une feuille exposée au CEM vers une autre feuille protégée du CEM, et ceci sous forte dépendance du calcium, de l'acide abscissique et de l'acide jasmonique. Le CEM HF de faible amplitude utilisé pour ce travail est suffisant pour conduire à la genèse d'une réponse à distance au sein de la plante, qui passe probablement par la genèse d'ondes électriques.

Ces dernières observations apportent une analogie supplémentaire qui permet de renforcer l'hypothèse selon laquelle le CEM HF est perçu par la tomate comme un stimulus environnemental.

Amplitude	Durée	Réponse
0,5 V/m	10 min	-
5 V/m	2 min	-
5 V/m	10 min	+
40 V/m	10 min	+

Tableau 4 : réponse des plantes en fonction de l'énergie transmise par les différents traitements EM
« - », pas de réponse ; « + », réponse observée (accumulation du marqueur *pin2*). La valeur 0,5 V.m⁻¹ correspond au champ résiduel à l'intérieur de la chambre de culture blindée.

2.3. Modulation de la concentration du milieu en calcium

Le calcium est un acteur central de la réponse des plantes aux blessures et stress environnementaux, ses nombreux rôles sont largement décrits dans la littérature (Trewavas et Gilroy, 1991 ; Sanders *et al.*, 2002 ; Nayyar, 2003). De plus, des variations de la distribution en calcium ont été rapportées après traitement EM HF chez le lin (Tafforeau *et al.*, 2002). Nous avons étudié les effets que pouvait avoir la concentration en calcium en ajoutant individuellement différents chélateurs et inhibiteurs dans les milieux de culture (Figure 30). Des travaux récents dans notre équipe, utilisant une combinaison d'EGTA et de chlorure de lanthane (LaCl_3), ont montré que le calcium était indispensable à la genèse et/ou la transmission de la réponse au CEM HF dans les tissus distants de la zone exposée (Beaubois *et al.*, 2007). Les concentrations ainsi que les temps de traitement utilisés ont été choisis au regard de l'expérience du laboratoire ainsi que de la littérature (Depège *et al.*, 1997) : ces drogues inhibent la réponse des plantes aux situations de blessures chez la Bident (Vian *et al.*, 1997). Elles sont fréquemment utilisées en physiologie végétale pour des études s'intéressant aux rôles du calcium. Par exemple le BAPTA et le chlorure de lanthane ont été utilisés sur des corolles de pétunia pour des études sur le métabolisme de l'acide gibbérélique (Leitner-Dagan et Weiss, 1999) et sur les caractéristiques de la paroi cellulaire chez la tomate (Thompson, 2005) ; l'EGTA et le chlorure de lanthane ont été utilisés pour des études sur les réponses au froid chez *Arabidopsis thaliana* (Knight *et al.*, 1996), sur la photorégulation de gènes chez le maïs (EGTA, Shiina *et al.*, 1997) ou encore chez la tomate dans la signalisation du stress (LaCl_3 , Yakimova *et al.*, 2007).

Une comparaison directe entre les amplitudes des réponses et les concentrations en calcium (Tableau 5) montre que les transcrits codant pour des protéines affines du calcium (calm-n6 et lecdpk1) s'accumulent de manière importante qu'en présence d'une concentration standard en calcium, alors que l'accumulation du transcrit pin2, a priori indépendant du calcium, n'est pas ou peu affectée par des concentrations élevées en calcium.

[Calcium]	5 min			15 min		
	calm-n6	lecdpk1	pin2	calm-n6	lecdpk1	pin2
++	1,3 ± 0,6	1,2 ± 0,5	1,8 ± 0,4	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,2	2,8 ± 1,3
+	3,3 ± 0,6	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,3	5,5 ± 1,9	5,3 ± 1,3	3,6 ± 0,3
-	2,3 ± 0,6	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2	3,6 ± 1,6	4,1 ± 0,6	4,2 ± 0,9
--	1,2 ± 0,6	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1

Tableau 5 : effet de la concentration en calcium sur l'accumulation des transcrits en réponse au CEM. Le tableau reprend les résultats de la Figure 30. Rappel : la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ramène l'abondance de référence de chaque marqueur à la valeur « 1 » (cf. mat. et méth.). Tout écart représente une variation de l'abondance du marqueur par rapport à la mesure faite avant stimulation EM (référence). « + » : concentration standard en calcium ; « ++ » : concentration x 10 ; « - » : pas de calcium incorporé au milieu ; « -- » : idem, avec ajout d'agents chélateurs.

Les résultats en présence d'EGTA (chélateur le moins spécifique), de BAPTA (chélateur spécifique du calcium) et de chlorure de lanthane (LaCl_3 , inhibiteur des canaux calciques membranaires) convergent et montrent qu'une quantité minimum de calcium est nécessaire pour obtenir une réponse moléculaire locale, quelque soit le transcrit. En diminuant au maximum la concentration en calcium des milieux déjà dépourvus, par l'ajout de ces différents agents chimiques, aucune accumulation n'est observée.

Ces résultats suggèrent l'existence d'un système de rétro-contrôle au travers duquel la cellule diminuerait l'abondance des transcrits codant des protéines affines du calcium lorsque la concentration en calcium s'accroît. Le calcium apparaît nécessaire à la genèse de la réponse des plantes au CEM en terme d'accumulation de transcrit, ce qui est en accord avec ses rôles dans la transcription (Sathyanarayanan et Poovaiah, 2004) par son action sur de nombreuses protéines et le fait que cet ion soit indispensable à l'activité de l'ARN polymérase II (Coulon et Blanchard, 2001). L'inhibition que nous observons pour les faibles et fortes concentrations en calcium peut être en partie expliquée du fait que le calcium (directement ou par le complexe qu'il forme avec la calmoduline ou d'autres calcioprotéines) soit capable d'autoréguler sa concentration en agissant par exemple sur les pompes Ca^{2+} /ATPases (Harper, 2001), elles-mêmes impliquées dans la transduction cellulaire. Le fait que le calcium soit un acteur ubiquiste de la transduction, présent dans la régulation fine de nombreuses voies différentes (Medvedev, 2005) implique forcément des phénomènes d'inhibition lorsque sa concentration varie anormalement.

L'influence qu'a la concentration en calcium sur les réponses moléculaires que nous avons décrites jusqu'à maintenant confirme que les voies de transduction « classiques » du stress au niveau cellulaire sont activées par l'action du CEM HF sur les plants. Cela apporte une preuve supplémentaire de la perception du champ par les cellules.

3. Mécanismes de perception et de transduction

L'ensemble de la littérature s'accorde sur le fait que les mécanismes initiaux d'interaction entre les CEM HF et le vivant, en dessous des limites d'effets thermiques, restent assez flous (Repacholi et Greenbaum, 1999 ; Lacy Hulbert *et al.*, 1998). Comme le soulèvent certains auteurs (Valberg *et al.*, 2007), le phénomène étudié fait intervenir plusieurs disciplines scientifiques (physique, chimie, biologie) dont il est impératif de tenir compte pour proposer des hypothèses crédibles quant à l'interaction.

3.1. Les membranes comme sites privilégiés d'interaction

Plusieurs aspects des résultats argumentent en faveur de l'hypothèse selon laquelle les membranes cellulaires seraient la cible principale de l'action du CEM HF ou au moins que c'est à leur abord que s'initie la réponse cellulaire. La membrane tient le rôle d'interface et de support à la plupart des éléments déclencheurs de la réponse aux stimuli (récepteurs chimiques, mécaniques, protéines kinases, pompes, canaux ioniques sensibles à la pression, aux mouvements, à certaines molécules... cf. § Synthèse Bibliographique 4.2). Nous avons vu que le CEM HF conduit à l'accumulation d'ARNm selon un profil typique de stress (localement mais aussi à distance, Beaubois *et al.*, 2007) et que ces mêmes transcrits sont ensuite pris en charge par les polysomes. Ces observations sous-entendent que les voies de transduction cellulaires sont activées par l'action du CEM HF ce qui amène logiquement une interaction de celui-ci avec la membrane cellulaire et plusieurs cibles sont possibles.

a. Le calcium

Il a été démontré que des micromouvements de calcium (Knight *et al.*, 1991) au voisinage de la membrane plasmique constituent l'évènement déclencheur de la réponse cellulaire à un stimulus (Sathyanarayanan et Poovaiah, 2004). Il est possible de corréler ces mouvements de calcium à l'action du CEM HF dans la mesure où nous avons montré suite au traitement EM, que les réponses moléculaires (notamment l'accumulation de deux transcrits codant pour des calcioprotéines) sont fortement dépendantes du calcium. Des variations de la concentration cytosolique en calcium (Tafforeau *et al.*, 2002) ont également été observées après stimulation EM de plants de lin. En théorie, en dehors des nombreux mécanismes qui peuvent conduire indirectement à des mouvements de calcium, le CEM HF peut avoir une action directe sur les flux : il peut influencer les transporteurs d'ions transmembranaires (Galvanovskis et Sandblom 1997; Aldinucci *et al.*, 2003), et interagir avec les molécules chargées, notamment les protons (Levin, 2003), le calcium lui-même (Goodman et Blank, 2002) et peut conduire au déplacement d'équilibres ioniques (Challis, 2005). Le CEM pourrait produire un infime déplacement d'ions, et/ou une modification du pH, quantitativement faible mais physiologiquement significatif, suffisant pour être amplifié en réponse cellulaire (pH et mouvements d'ions étant intimement liés, Colcombet *et al.*, 2005).

b. Les chaînes de transport d'électron et l'ATPase

Nous avons vu que la charge énergétique adénylique et la concentration en ATP sont affectées par l'action du CEM HF. Nous avons également montré que les réponses moléculaires induites (accumulations de transcrits) sont inhibées par l'ajout d'un découplant. Nous pouvons corréler ces observations au fait que le système énergétique cellulaire est une cible potentielle du CEM HF. Une étude récente a montré qu'il est possible de détecter le fonctionnement des chaînes de transport d'électron ainsi que l'ATPase (sur les membranes des mitochondries et des thylacoïdes) en mesurant les interférences que ces « moteurs » produisent sous irradiation par un CEM (Miller *et al.*, 2005).

Par définition, le CEM interagit avec toute molécule chargée en mouvement (Levin, 2003) et peut en modifier la trajectoire. Ainsi, la chaîne respiratoire mitochondriale peut être directement influencée par le CEM (Kohane et Tiller, 2000), tout comme l'activité de l'ATPase dont la conformation peut être modifiée (Astumian, 2003). Même si leurs effets sont limités, ces divers modes d'interaction peuvent être des éléments déclencheurs de la réponse cellulaire.

c. Les variations de potentiels membranaires

Des travaux récents (Beaubois *et al.*, 2007) ainsi que nos résultats ont permis de corréler l'action du CEM HF à la genèse de signaux électriques au sein de la plante (réponse de type « tout ou rien »). La membrane cellulaire intervient puisqu'elle représente le support physique nécessaire à l'apparition de ces variations de potentiel, étape précoce de la réponse cellulaire. Concrètement, l'hypothèse de l'action du CEM HF sur le voisinage membranaire et plus précisément sur les ions est en accord avec la nature des signaux électriques qui se propagent au sein de la plante lors de phénomènes systémiques de réponse aux stress. En effet, les potentiels d'action enregistrés nécessitent le mouvement de plusieurs ions (Davies, 2006 ; Davies et Stankovic, 2006) notamment le calcium (Ca^{2+}), le chlore (Cl^-) et le potassium (K^+). En fait, l'environnement ionique, énergétique et protéique de part et d'autre des membranes est très sensible et réagit aux moindres fluctuations ce qui fait que la région voisine des membranes représente le point de départ de la plupart des événements cellulaires de réponse à des stimuli externes (Trewavas, 2002). En regroupant toutes les hypothèses d'interaction, cette région devient une cible privilégiée pour le CEM HF (Luben, 1991 ; Galvanovskis et Sandblom, 1997 ; Lacy Hulbert *et al.*, 1998 ; Astumian, 2003 ; Piacentini *et al.*, 2004). Cependant, la manière dont le CEM HF pourrait conduire à la genèse des variations de potentiel nécessite d'être démontrée.

d. Les protéines

Les CEM seraient capables de réguler l'activité, la localisation cellulaire et l'interaction de certaines protéines, en agissant sur les liaisons faibles qui déterminent, en partie, leur conformation (Challis, 2005). Plusieurs études montrent aussi que le CEM peut influencer la phosphorylation des protéines (REFLEX, 2004), notamment les HSP (Wang *et al.*, 2006). Dans ce contexte, de très nombreuses protéines libres ou membranaires peuvent être influencées et représentent toutes des déclencheurs potentiels d'une réponse cellulaire : par exemple les transporteurs ioniques passifs et actifs, les ATPases, des facteurs de transcription et les très nombreuses protéines kinases libres ou ancrées dans les membranes cellulaires (Trewavas, 2002). La voie déclenchée serait fonction du type et de la localisation de la protéine initialement « activée » par le CEM. Cette approche reste difficile à aborder à cause de la grande variabilité de structures qui existe entre les protéines et le contexte aqueux dans lequel elles se trouvent qui joue un rôle primordial (Cotgreave, 2005).

3.2. Autres interactions

a. Les effets athermiques

Les limites d'exposition de la population au CEM, telles qu'elles sont définies par l'ICNIRP (INCIRP, 1998), éliminent toute possibilité d'effet sur le vivant par des actions directes de type stimulation « thermique » ou « électrique ». Selon ces restrictions, les équipements sans fil ne doivent pas exposer les utilisateurs à des CEM de plus de $0,2 \text{ mW.cm}^{-2}$ ce qui représente une énergie insuffisante pour générer une élévation de température au sein d'un tissu biologique. Nos conditions expérimentales (Figure 22) permettent d'écarter les effets directs de type thermique qui sont cependant fréquemment décrits (D'Andrea *et al.*, 2003 ; Meltz, 2003). Nous avons vu que l'énergie utilisée ici est très faible et que la température reste inchangée durant l'exposition. Les protéines de type HSP sont typiquement utilisées comme marqueurs de la réponse des cellules à des variations de température (Tissieres *et al.*, 1974).

C'est pourquoi la littérature concernant le CEM HF leur fait souvent référence (Lixia *et al.*, 2006). Cependant, le CEM peut interagir avec le vivant à travers des phénomènes athermiques : une étude a par exemple montré que les promoteurs de ces mêmes protéines HSP contiennent des régions particulièrement sensibles aux CEM (Goodman et Blank, 2002) capables d'influencer leur expression. Outre le fait que les mécanismes d'interaction entre les CEM et le vivant ne se limitent pas à une excitation thermique et/ou électrique, des effets thermiques peuvent avoir lieu mais à une échelle difficilement quantifiable par les méthodes traditionnelles de mesure de la température.

La notion de « athermal heating » évoquée dans la littérature résume bien la situation (Cotgreave, 2005). En théorie, des micro-effets thermiques, plus rapides qu'une hausse générale de température, très localisés, ont été évoqués par plusieurs auteurs (Challis, 2005), notamment en relation avec la viscosité du milieu aqueux cellulaire (chargé en ions et protéines) qui a vraisemblablement son importance dans les phénomènes d'interaction (Cotgreave, 2005). L'effet thermique considéré par les normes sous-entend un déplacement par le CEM HF de l'équilibre de thermorégulation, c'est à dire une augmentation de 1°C de la température d'un volume de tissu biologique. Or, les animaux complexes et l'homme ont une thermorégulation très efficace : il faut une énergie importante pour faire augmenter la température d'un tissu (Ahlbom *et al.*, 2004). C'est pourquoi, la description des mécanismes d'interaction CEM / vivant couramment appelés « non thermiques » devrait en premier lieu s'orienter vers des microphénomènes thermiques. L'hypothèse principale est la relaxation des molécules d'eau, utilisée dans le fonctionnement des fours à micro-onde. L'eau fait partie des molécules polarisées de petite taille, elle se réoriente dans l'espace sous l'action d'un CEM ce qui a pour conséquence immédiate un échauffement local du milieu, sous dépendance de sa viscosité (Challis, 2005 ; Cotgreave, 2005). Ceci intervient aux fréquences utilisées par la téléphonie mobile (proches de 1 GHz).

b. La plante entière

La plante dans sa globalité représente un bon conducteur des courants électriques puisque composée à 95 % d'eau et contenant diverses concentrations d'ions et autres molécules organiques plus ou moins chargées. De plus, les composants de sa structure interne : vaisseaux conducteurs de sève, compartiment apoplastique et symplastique forment un réseau hydraulique continu de la pointe des racines à la dernière feuille. Ainsi, de par leur taille et leur surface foliaire, il est possible de considérer les plants de tomate comme des antennes réceptrices de tout ou partie du rayonnement EM (Bonnet *et al.*, 2006).

Par définition, pour un CEM de longueur d'onde λ , la taille d'une antenne filaire doit être comprise entre λ et $\lambda/4$ (idéalement un nombre entier de fois $\lambda/4$) pour pouvoir résonner et récupérer de l'énergie fournie par le CEM (comportement de type dipôle). Pour cette étude nous avons utilisé un CEM de fréquence 900 MHz, ce qui correspond à une longueur d'onde λ de 33 cm, dans lequel nous avons immergé des plants de tomate âgés de 3 semaines mesurant entre 25 et 35 cm (soit $\approx \lambda$), de la pointe des racines à la feuille apicale. En considérant ceux-ci comme des antennes de part leur structure interne et externe, ils sont capables de capter préférentiellement une partie du rayonnement EM.

Nous pouvons alors formuler un lien avec les réponses cellulaires puisque les membranes des cellules sont très sensibles aux courants électriques, notamment grâce aux canaux ioniques dépendant du voltage (Thuleau *et al.*, 1994). De plus, la plante utilise naturellement des signaux électriques pour véhiculer localement et de manière systémique des réponses cellulaires aux stress environnementaux (Davies, 2006) ainsi qu'en réponse à l'irradiation par un CEM HF (Beaubois *et al.*, 2007).

c. Des récepteurs dédiés

L'hétérogénéité des tissus biologiques et la viscosité très variable permettent à certaines microstructures organiques d'être excitées par vibration ou transmission partielle de l'énergie du CEM HF (Challis, 2005). Ces hypothèses sont complexes à étudier et dépendent aussi des propriétés du champ (fréquence et amplitude). Des travaux montrent que les systèmes photosynthétiques (activité du photosystème II, taux de photosynthèse) sont influencés par les CEM HF, notamment chez la tomate (Stašelis *et al.*, 2004), le soja et le bananier (Song *et al.*, 2004).

Les photosystèmes végétaux sont des structures capables de capter préférentiellement les rayonnements EM : ils récupèrent l'énergie des photons pour la transférer ensuite vers des mécanismes cellulaires. La chaîne de transfert d'électrons, associée aux antennes collectrices des photosystèmes, le tout intégré dans la membrane des thylacoïdes, est capable de transformer l'énergie électromagnétique (lumière solaire) en énergie chimique (production de molécules réductrices et d'ATP).

Il n'est pas exclu que ce type de structures soit influencé par le CEM HF ce qui contribuerait à l'initiation des réponses cellulaires. Un aspect de nos résultats supporte cette hypothèse puisque nous avons vu que le marqueur *cmbp*, qui est un facteur de maturation des ARNm codant pour des protéines à destination du chloroplaste, s'accumule en réponse au CEM HF (Figure 26), tout comme en réponse à une blessure.

4. Démarche et limites

4.1. Importance des conditions expérimentales

Nous avons vu à travers la bibliographie que la crédibilité d'une étude sur les effets biologiques des CEM HF repose en grande partie sur la construction de la démarche expérimentale étant donné les particularités du traitement. Nous nous sommes attachés à construire celle-ci en limitant au maximum la présence de biais ou paramètres non contrôlés (la seule variable devant être le CEM HF), notamment en nous plaçant dans un contexte réunissant des laboratoires de physique et de biologie de manière à potentialiser les compétences de chaque domaine.

a) Un modèle vivant Eucaryote : *Lycopersicon esculentum* Mill. VFN8 (Tomate).

Pour ce travail, nous avons choisi un modèle vivant pour lequel nous pouvons maîtriser toutes les variables nécessaires à son maintien. La tomate s'est avérée être un bon modèle de par sa forme érigée au stade 4^{ème} feuille émergente (facilitant sa culture et le prélèvement d'échantillons), sa croissance rapide et homogène entre plantes différentes (les tomates se reproduisent par autofécondation, ce qui entretient la stabilité des lignées) et enfin sa facilité de culture en conditions hydroponiques. Le choix d'un modèle végétal présente plusieurs avantages sur un modèle animal :

- le fait que les plantes soient immobiles évite la mise en place de dispositifs contraignant leurs mouvements.

- cette propriété implique aussi que les plantes sont des capteurs remarquables des variations environnementales (Ferguson, 2004 ; Malek et Dietrich, 1999). Historiquement, la tomate est un modèle d'étude pour le stress des végétaux (Green et Ryan, 1972).

- enfin, les plantes produisent leurs propres nutriments au cours de la photosynthèse, même si elles fonctionnent sur un rythme circadien, elles ne souffrent pas de modifications métaboliques conséquentes à une carence ou une absorption de nourriture.

b) Un mode de culture stable et contrôlé : la culture hydroponique s'est imposée ici dans le but de supprimer toute variabilité entre milieux de culture. Cette méthode hors sol est très répandue, et spécialement adaptée pour la culture de la famille des Solanacées (Robin, 1998). En comparaison avec l'utilisation d'un support solide (terreau, vermiculite, perlite), elle permet un contrôle précis de la disponibilité en macro et micro éléments nutritifs et supprime les contraintes liées à l'humidification du support. Nous avons préparé une seule et unique solution répartie dans les bacs contenant les lots de plantes (Annexe 1), ces solutions sont ensuite individuellement brassées par le système d'aération du système racinaire. Enfin, nous avons choisi la culture sur support liquide et brassé car elle facilite grandement les expériences impliquant l'absorption de composés chimiques (EGTA, BAPTA, LaCl_3) dont il est nécessaire de contrôler la concentration et le temps de mise en contact avec les plants.

c) Un matériel d'exposition dédié à l'étude des CEM : la Chambre Réverbérante à Brassage de Modes (CRBM). Cet équipement, agréé pour la réalisation de mesures en électromagnétisme (IEC, 2003), permet d'assurer le contrôle et la répétabilité des signaux électromagnétiques générés (source d'irradiation des plantes) dans un environnement protégé des pollutions EM extérieures (Otterskog et Madsén, 2003). De plus, le champ émis à l'intérieur est statistiquement homogène et isotrope ce qui signifie qu'il irradie les échantillons avec la même amplitude depuis toutes les directions de l'espace, supprimant l'éventuel biais dû à une orientation particulière du champ. En outre, le grand volume d'essai nous a permis d'y installer aisément les chambres de cultures de manière à traiter en une seule fois plusieurs lots de plantes sans aucune manipulation de celles-ci. Nous avons choisi la durée, la fréquence et l'amplitude du CEM dans le but de représenter de manière générale un appel téléphonique GSM moyen (nous n'avons appliqué aucune modulation particulière au signal dans un souci de simplification et dans la mesure où aucune corrélation avec des effets biologiques n'a été montrée, cf. Synthèse Bibliographique). Il est important de noter que l'ensemble des expériences effectuées au cours du présent travail a été réalisé sur plante entière.

Ces conditions n'ont pas permis d'étudier ces phénomènes systémiques (transmission d'un signal au sein de la plante depuis un tissu local vers un tissu distant), abordés cependant par des travaux récents dans notre laboratoire (Beaubois *et al.*, 2007). En revanche, l'exposition globale des plantes couplée aux caractéristiques du CEM ont assuré une stimulation à la fois homogène de chaque plante ainsi qu'entre plantes différentes ce qui permet d'écarter tout biais inhérent au traitement EM.

d) Un traitement bref et de faible amplitude (10 min, 900 MHz, 5V.m⁻¹) ainsi que l'étude d'événements précoces (au cours de l'heure suivant le traitement) : il est d'autant plus difficile d'établir un lien direct entre l'effet biologique observé et le stimulus EM que le délai entre les deux est long. Cela pose régulièrement problème pour les études des risques sanitaires qui se positionnent à long terme. Pour ce travail, nous avons choisi un temps d'exposition raisonnablement court (10 minutes) par rapport à la durée totale des expériences, elles-mêmes centrées sur une mesure rapide des effets biologiques.

e) La mesure de paramètres sensibles et précis tels que l'abondance d'ARN messagers et l'état énergétique cellulaire (concentration en ATP, CEA) : tout comme les études à long terme, l'analyse de paramètres trop complexes limite la probabilité qu'il y ait un lien direct entre le traitement et les réponses mesurées, de nombreux autres facteurs pouvant alors intervenir. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux tous premiers paramètres concrets mesurables, bien en amont de marqueurs physiologiques tels que des modifications de croissance par exemple. Les ARNm qui ont fait l'objet de ce travail sont impliqués dans la physiologie du stress. De même, la mesure de la CEA, qui constitue un instantané de l'état énergétique cellulaire, cadre avec notre souci de vouloir diminuer au maximum le délai entre le traitement EM et les réponses moléculaires observées.

4.2. Limites de l'étude

Depuis longtemps utilisée pour l'étude des phénomènes de réponses aux stimuli environnementaux, la tomate (*Lycopersicon esculentum*) constitue un très bon modèle vivant pour l'étude de la perception des champs électromagnétiques hautes fréquences de faible amplitude : il s'avère que des réponses typiquement rencontrées à la suite de blessures sont observées après exposition de jeunes plants au CEM HF. La principale observation faite tout au long de ce travail est l'analogie formelle avec la réponse des plantes aux stimuli : le CEM HF ne traverse pas la plante sans être perçu, ce qui permet de le considérer comme un stimulus environnemental à part entière.

Il est important de retenir que la perception de signaux électromagnétiques hautes fréquences par un système vivant met en jeu un certain nombre de mécanismes qui font appel à des domaines scientifiques très différents : comme l'explique une revue récente (Valberg, 2007), l'interaction CEM HF/vivant met tout d'abord en jeu des rayonnements (phénomènes de physique), qui peuvent influencer certaines structures et/ou molécules (domaine de la chimie) pour finalement produire tel ou tel effet physiologique (études biologiques). Dans ce dernier niveau, apparaissent encore plusieurs étapes (transduction, transmission, régulation) pour éventuellement conduire à un effet physiologique. L'ensemble de la chaîne de mécanismes est complexe et très dépendante du modèle étudié.

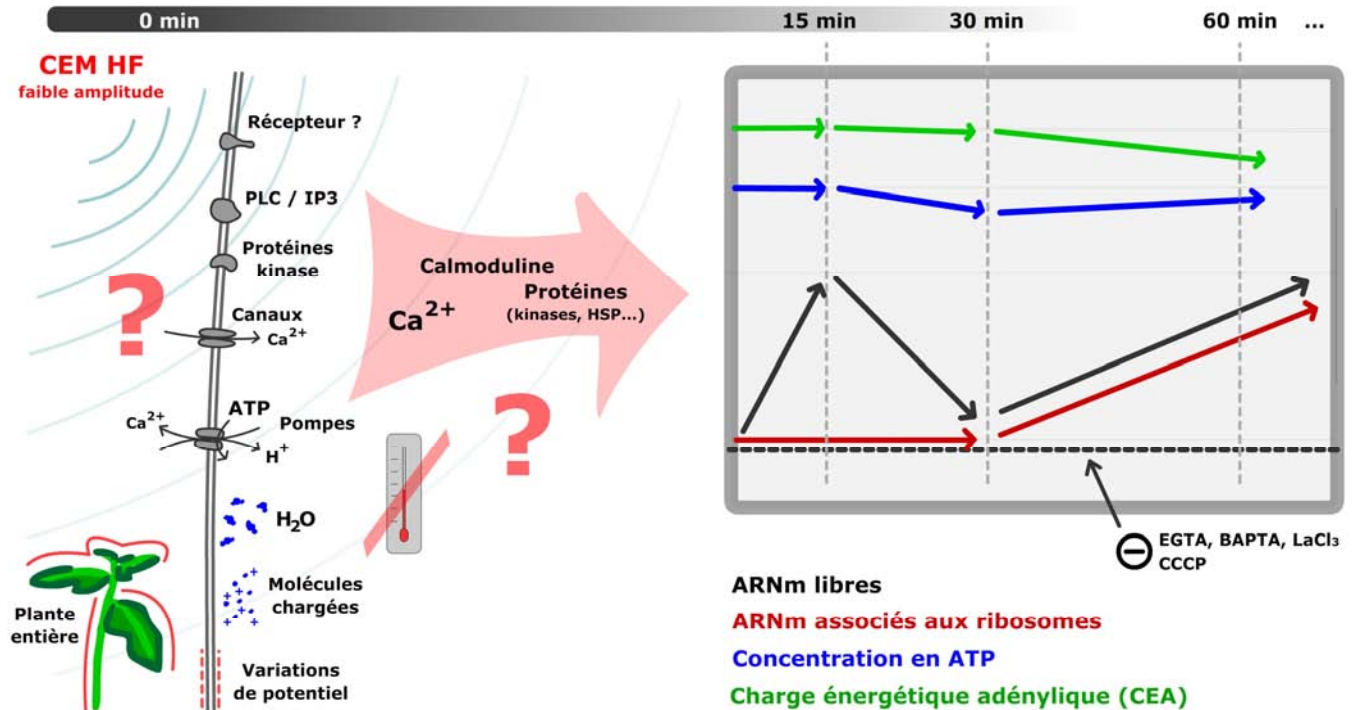
D'une manière générale, bien que leurs valeurs ne doivent pas être sous-estimées, l'ensemble des conclusions extraites de cette étude ne peuvent pas et ne doivent pas être extrapolées à d'autres modèles notamment animaux. De surcroît, l'objectif de ce travail n'est pas d'apporter des informations en terme de risque mais en terme d'effets biologiques. Nous ne pouvons pas émettre d'hypothèses quant à l'innocuité ou la nocivité des CEM HF de faible amplitude et il faut retenir qu'à l'heure actuelle, aucune conclusion définitive ne ressort de la littérature à propos de la population humaine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES ::

Ce travail montre formellement et sans ambiguïté qu'un champ électromagnétique de haute fréquence, de faible amplitude et de faible durée (900 MHz, 5 V.m⁻¹, 10 min) induit rapidement (dans l'heure qui suit) la modification de plusieurs marqueurs cellulaires chez la tomate. De plus, les voies classiques de transduction interviennent dans la signalisation du stimulus EM. La Figure 39 synthétise l'ensemble de ce rapport.

Chacune de nos observations permet d'établir un lien formel entre le traitement électromagnétique et les réponses mesurées en faisant ressortir les analogies avec des situations de stress. Ainsi, le CEM HF modifie l'abondance de plusieurs transcrits selon un profil typique (triphasique) et sous forte dépendance du calcium, ces mêmes transcrits sont ensuite pris en charge par les polysomes. Parallèlement, des marqueurs énergétiques (ATP, CEA) sont fortement affectés. Tous les paramètres que nous avons évalués varient selon des chronologies imbriquées ce qui sous-entend un mécanisme commun. La réponse cellulaire au CEM HF de faible amplitude, qui n'est pas la conséquence d'une variation globale de la température, semble être commandée par une loi de type « tout ou rien » ce qui est en accord avec les mécanismes de signalisation de stress végétaux. L'objectif de ce travail n'était pas de déterminer les modes précis d'interaction du champ avec le vivant, cependant plusieurs aspects des résultats suggèrent l'hypothèse d'interaction avec les membranes cellulaires.

stimulus - perception - transduction - transmission - réponses précoces - réponses tardives



Hypothèses d'interaction du CEM avec la plante entière ainsi que la membrane, ses composants et son voisinage
-> Mécanisme de type "tout ou rien", indépendant de la température

Hypothèses d'action directe du CEM sur les voies de transduction du stimulus
-> Changement de conformation des protéines, flux d'ions ...

Réponses cellulaires au CEM HF de faible amplitude, **démontrées** :

- > accumulations triphasiques d'ARNm libres*
- > prise en charge des ARNm par les polysomes
- > chute de la concentration en ATP
- > chute de la CEA

*dépendantes de la disponibilité en calcium ainsi que du métabolisme énergétique

Figure 39 : schéma de synthèse.

La poursuite de ces recherches pourra s'intéresser à étendre les moyens de stimulation (CRBM + CEM) à d'autres modèles vivants (cultures cellulaires, procaryotes, animaux simples). Les conditions expérimentales que nous avons développées permettent aisément de travailler avec d'autres modèles vivants si le choix de ces modèles est cohérent. C'est-à-dire que leur complexité d'étude et/ou de maintien ne doit pas interférer avec la finesse des paramètres mesurés notamment par l'apport de biais importants. Un programme est d'ores et déjà développé au sein du LASMEA pour déterminer les voies métaboliques affectées à court terme par le même type de CEM HF sur des kératinocytes humains (Programme MAPHYS, financé par la Fédération Santé et Radiofréquences, dont le coordinateur est A.Vian). Il s'agit dans un premier temps de transposer les marqueurs du présent travail sur ce nouveau modèle avant de poursuivre l'étude de manière plus exhaustive via l'utilisation d'une biopuce.

Développer une approche similaire sur la tomate, c'est-à-dire comparer les réponses des marqueurs entre plantes exposées et protégées du CEM HF de manière plus exhaustive, permettrait d'avoir une vue d'ensemble des mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse au champ. La possibilité de pouvoir comparer les motifs d'expression entre modèle animal et végétal pour ce même stimulus apporterait de solides hypothèses quant aux phénomènes d'interaction du CEM HF de faible amplitude avec le vivant et les réponses impliquées.

En parallèle, il peut être intéressant d'approfondir la connaissance des mécanismes intervenant dans la perception du signal électromagnétique chez les plantes, notamment les hypothèses soulevées au court de ce travail. De telles approches doivent tenir compte des propriétés physiques du CEM pour déterminer les cibles biologiques les plus potentiellement « réceptrices ». Nous avons vu que les cibles possibles sont les structures ou mécanismes faisant intervenir des charges électriques directement ou indirectement. Il est donc particulièrement utile de se focaliser sur les membranes et leur voisinage notamment les potentiels électriques, la fluidité et les protéines membranaires (pompes, canaux ioniques, récepteurs), les flux d'ions ou encore les chaînes de transport d'électrons (antennes collectrices, photosynthèse, respiration).

Des méthodes intéressantes concernent la mise en évidence des mouvements de calcium sous l'influence du CEM (utilisation de plantes exprimant l'aequorine, protéine dont la bioluminescence dépend de la présence de calcium). Une approche semblable utilise des protéines modifiées dont la fluorescence change selon la conformation. En fait, les plantes mutantes ainsi que les nombreuses molécules bloquantes ou inhibitrices représentent des outils particulièrement pratiques pour se focaliser sur une cible particulière.

Des études d'électrophysiologie sont en cours pour apporter ou non des éléments en faveur de l'hypothèse électrique pour la transduction du stimulus EM en réponses moléculaires et approfondir la connaissance des mécanismes impliqués : le but est également d'analyser les phénomènes d'ondes électriques qui interviennent dans la transmission locale et systémique des stress en utilisant le CEM comme outil de stimulation non invasif et non destructeur (aucune preuve ni trace de l'existence d'un dommage mécanique n'a été apportée jusqu'à maintenant).

Cette étude s'est focalisée sur les réponses à court terme dans l'objectif d'établir un lien direct sans biais avec le stimulus électromagnétique. Dans un premier temps, nous pouvons essayer de préciser le devenir des différents pools d'ARNm observés (ainsi que leurs rôles dans la réponse cellulaire) et préciser les modifications du métabolisme énergétique. Nous pouvons aussi aborder des aspects non développés de la réponse cellulaire tels que le métabolisme oxydatif, l'intervention des phospholipases et des messagers secondaires lipidiques (PLC, IP_3), la production de précurseurs pseudo hormonaux tels que le polypeptide systémine. Cependant, l'effet rapide du CEM sur les cellules est démontré chez les végétaux, il est maintenant possible d'élargir notre approche sur des paramètres physiologiques à plus ou moins long terme tels que des modifications de croissance, de floraison, l'activité photosynthétique et/ou des paramètres structurels. Il faudra néanmoins veiller à la stabilité des conditions de maintien puisque l'augmentation du délai entre le traitement EM et la mesure d'un paramètre biologique diminue fortement la probabilité d'un lien direct de cause à effet.

ANNEXES ::

Solution de culture Hydroponique, tomate (pour 20 L)

Macro-éléments : (préparer une solution par sel)

Solution n°	Sel	Quantité (g/l)	Stockage
1	NaCl	10	T° ambiante
2	Mg SO ₄ 7 H ₂ O	270	4°C
3	(NH ₄) ₂ SO ₄	72,5	4°C
4	Ca (NO ₃) ₂	345	4°C
5	K NO ₃	202	T° ambiante
6a	K ₂ H PO ₄	192	T° ambiante
6b	K H ₂ PO ₄	150	4°C

-> Prélever 10 ml de chaque solution pour 20 L de solution finale.

Micro-éléments : (préparer une solution mère de 200 ml, stocker à 4°C)

Sel	Quantité (mg)
Mo O ₄ (NH ₄) ₂	100
Mn SO ₄ H ₂ O	610
Zn SO ₄ 7 H ₂ O	880
H ₃ B O ₃	560
Cu SO ₄ 5 H ₂ O	196

-> Prélever 4 ml de la solution mère pour 20 L de solution finale.

Concentration des sels dans la solution finale :

Macro-éléments	Concentration	Micro-éléments	Concentration
NaCl	85 µM	Mo O ₄ (NH ₄) ₂	0,5 µM
Mg SO ₄ 7 H ₂ O	0,55 mM	Mn SO ₄ H ₂ O	3,5 µM
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,27 mM	Zn SO ₄ 7 H ₂ O	4,9 µM
Ca (NO ₃) ₂	0,73 mM	H ₃ B O ₃	9,1 µM
K NO ₃	1 mM	Cu SO ₄ 5 H ₂ O	0,8 mM
K ₂ H PO ₄	5,5 mM		
K H ₂ PO ₄	7,2 mM		

Mascolate de fer 2% : 2 ml pour 20 L final (0,2 ‰).

Conditions de cultures

Six plantes sont disposées des bacs de 900 ml. Elles sont maintenues dans les orifices d'une plaque de polystyrène grâce à une bague en mousse et des tubes en plastique disposés sur le collet. Une puissante pompe à air alimente chaque bac par l'intermédiaire d'un bulleur. La température et l'éclairement sont régulés : une photopériode de 16 h jour – 8 h nuit (avec une intensité lumineuse de 150 µmol.m⁻².s⁻¹ au bas du caisson à 175 µmol.m⁻².s⁻¹ au niveau des feuilles terminales) alternant 25°C le jour et 21°C la nuit.



Extraction des ARN totaux

Solutions :

- TRI-Reagent (référence SIGMA T9424)
- Chloroforme
- Isopropanol
- Ethanol 75 %

Protocole :

- Broyer les tissus congelés (feuilles terminales) dans 1 ml de TRI-Reagent (mortier)
- Transférer la solution dans un tube
- Agiter (Vortex)
- 5 minutes de lyse des tissus
- Agiter (Vortex)
- Ajouter 800 µl de chloroforme (séparation des phases)
- Agiter (Vortex)
- Centrifuger 10 minutes à 12000 rpm (4°C)
- Récupérer la phase aqueuse (supérieure)
- Ajouter 700 µl d'isopropanol (précipitation des ARN)
- Mélanger par inversion
- Centrifuger 15 minutes à 12000 rpm (4°C)
- Jeter le surnageant
- Rincer les culots d'ARN 2 fois avec 200 µl d'éthanol 75 %
- Laisser s'évaporer les traces d'éthanol
- Reprendre les culots dans 30 µl d'eau stérilisée
- Conserver les ARNm à – 20°C (jusqu'à l'étape suivante de Reverse Transcription)

Annexe 3 : protocole d'extraction des ARN polysomiques.

Extraction des ARN polysomiques

Préparation pour 4 essais de 6 échantillons (rotor ultracentrifugeuse 6 places Kontron TST 41.14)

Solutions :

- # DOC - Deoxycholate de sodium (SIGMA 30970)
- # PTE - Polyoxyethylene 10 tridecyl ether (SIGMA 2393)

Pré tampon U 2X pH 8,5 (200ml)

Saccharose	FW: 342,29 g/mol	27,4 g	400 mM
Tris/Hcl	Tris Hcl 1,5 M pH 8,5	53,3 ml	400 mM
MgCl₂	FW: 203,30 g/mol	2,4 g	60 mM
KCl	FW: 74,55 g/mol	1,8 g	120 mM
EGTA	EGTA 0,5 M pH 8,5	1,6 ml	4 mM
H₂O		QSP 200 ml	

Tampon B pH 8,5 (200 ml)

Tris/HCl	Tris Hcl 1,5 M pH 8,5	5,33 ml	40 mM
MgCl₂	FW: 203,30 g/mol	406 mg	10 mM
KCl	FW: 74,55 g/mol	298 mg	20 mM
H₂O		QSP 200 ml	

Autoclaver (110 °C, 15 minutes maximum) :

Mortier + pilons / Tubes pour centrifugeuse 35 ml / Tubes ultracentrifugeuse 11 ml / H₂O en aliquots de 50 ml / Pré tampon U en aliquots de 50 ml / Tampon B en aliquots de 20 ml

Préparation (le jour de l'extraction) :

- # 20 ml de DOC 10 % (Température ambiante)
- # 10 ml de Saccharose 50 % dans tampon B. Constituer les coussins de saccharose en déposant 1 ml de cette solution dans 6 tubes pour ultracentrifugeuse (tubes 11 ml, dans la glace).

Tampon U, à température ambiante, ajouter le DOC en dernier pour éviter sa précipitation:

- Pré tampon U 40 ml
- PTE 2 ml
- H₂O 30 ml
- DOC 10 % 8 ml

Protocole (à partir de tissus broyés dans l'azote liquide) :

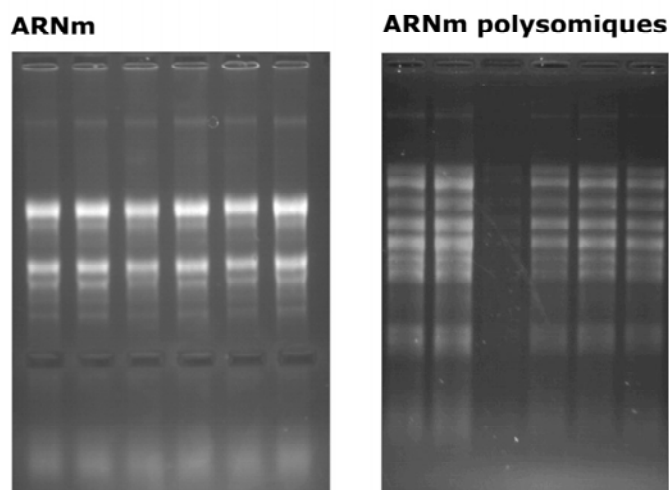
(Toutes les étapes se font dans la glace)

- Homogénéiser les tissus dans 6 ml de tampon U (au mortier)
- Ajouter du tampon U : volume final 13 ml
- Transférer la solution dans un tube de 35 ml
- Centrifuger 15 minutes à 13000 g à 4°C
- Déposer le surnageant sur les coussins de saccharose avec précaution
- Equilibrer les tubes avant l'ultracentrifugation
- Centrifuger 4 heures à 35000 rpm (240000g max)
- Jeter le surnageant
- Procéder à une extraction classique d'ARN sur les culots (TRI-reagent)

Annexe 4 : protocole de dosage et préparation des gels d'agarose et tampons.

ARN : dosages, gels & tampons

Les ARN sont dosés par spectrophotométrie. Leur absorption est mesurée à la longueur d'onde de 260 nm. Leur concentration est ensuite ajustée à 1 µg / µl par dilution avec de l'eau distillée. 5 µg de chaque échantillon sont ensuite prélevés, additionnés à 25 µl de tampon de charge puis l'ensemble est dénaturé à 65°C pendant 5 minutes puis immédiatement placé à 4°C avant d'être déposé sur un gel d'agarose pour un contrôle visuel de la qualité des ARN.



agarose 1.3 %

		Volumes	50	100	ml
-	Agarose :		0.65	1.3	g
-	H2O :		36	72	ml
-	MOPS 10x :		5	10	ml
(Porter à ébullition)					
-	Formaldéhyde:		9	18	ml

Tampon de charge

		Volumes	500	1000	µl
-	MOPS 10x (pH 7) :		50	100	µl
-	Formaldéhyde :		60	120	µl
-	Formamide :		250	500	µl
-	Bromure d'éthidium :		5	10	µl
-	Glycérol 50 %:		135	270	µl
-	Orange G (colorant):		Traces		

MOPS 10x pH 7 (NaOH)

-	MOPS :	20.9	g
-	Acétate de sodium :	3.4	g
-	EDTA 0.5 M (pH 8) :	10	ml (10mM)
-	H2O :	490	ml
		500	ml (pH 7)

Transcription Inverse

La synthèse des ADN complémentaires (ADNc) est possible à partir des ARN totaux et des ARNm polysomiques.

Protocole pour 12 échantillons

(Reverse Transcriptase Core Kit, référence RT-RTCK-03, Eurogentec)

Préparer une solution mère :

- Tampon de réaction 10x	13	µl
- MgCL2 (25 mM)	26	µl
- dNTP (25 mM)	26	µl
- oligo d(T) ₁₅	6,5	µl
- Inhibiteur de RNase	2,6	µl
- Transcriptase inverse	3,25	µl
- Eau distillée	39,65	µl

Déposer 1 µl de chaque échantillon (ARN) dans des microtubes.

Déposer 9 µl de la solution mère dans chaque tube.

Volume final : 10 µl.

Installer les tubes dans un thermocycleur programmé comme suit :

- Étape initiale : 10 minutes à 25°C
- Étape de transcription inverse : 30 minutes à 48°C
- Inactivation de l'enzyme : 5 minutes à 95°C









En fin de synthèse, ajouter 90 µl d'eau distillée dans chaque tube (vol. final : 100µl)

PCR quantitative en temps réel (RTqPCR)

Protocole pour 12 échantillons

(qPCR MasterMix Plus for SYBR Green I with fluorescein, référence RT-SN2X-03+NRFL, Eurogentec)

Agencement type d'une plaque PCR :

		Série 1				Série 2				Série 3			
		Echantillons n°											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Marqueur 1	A												
	B												
Marqueur 2	C												
	D												
Marqueur 3	E												
	F												
Norme	G												
	H												

- Chaque expérience représente trois séries de 4 échantillons (T 15 30 60) qui sont déposés en dupliqua sur la plaque PCR.
- Trois marqueurs différents peuvent être testés, le reste de la plaque servant aux mesures du marqueur servant de norme (*actin*).

Préparer une solution mère pour chaque marqueur (24 puits + 2) :

- Tampon de réaction 208 µl
- Amorce sens (5 ng / µl) 71,5 µl
- Amorce antisens (5 ng / µl) 71,5 µl

(Pour des raisons pratiques et de conservation, le tampon de réaction peut être aliquoté par 416 µl, soit une demie plaque PCR 96 puits + 4 puits).

- # Déposer 1,5 µl d'ADNc dans chaque puits.
- # Ajouter 13,5 µl de solution mère.

Vol. final : 15 µl

Lancer la PCR dans un thermocycleur programmé comme suit:

- Étape initiale : 2 min – 50°C
- Activation de l'enzyme : 10 min – 95°C.

42 cycles :

- Dénaturation : 15 sec – 95°C.
- Hybridation : 30 sec – 61°C*.
- Élongation : 30 sec – 72°C.

* la température idéale (pour plusieurs couples d'amorces utilisés simultanément) est obtenue par PCR en gradient de température.

Test d'efficacité d'amplification (1/2) - Mesures

But. Vérifier que deux couples d'amorces utilisés simultanément en PCRq ont la même efficacité d'amplification (pour pouvoir appliquer la loi du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ à l'analyse des résultats). Dans le cas contraire, il faut avoir recours à une quantification absolue.

Référence : Livak KJ, Schmittgen TD (2001)

Préparation de la plaque PCR. Préparer 5 dilutions pour le marqueur testé et le marqueur de référence (actin). Déposer les échantillons en duplicata sur la plaque PCR.

	1	2	3	4	5
marqueur	1	/ 3,2	/ 10	/ 32	/ 100
	1	/ 3,2	/ 10	/ 32	/ 100
témoin	1	/ 3,2	/ 10	/ 32	/ 100
	1	/ 3,2	/ 10	/ 32	/ 100
Concentration	1	0,32	0,1	0,032	0,01
(-log C)	0	0,5	1	1,5	2

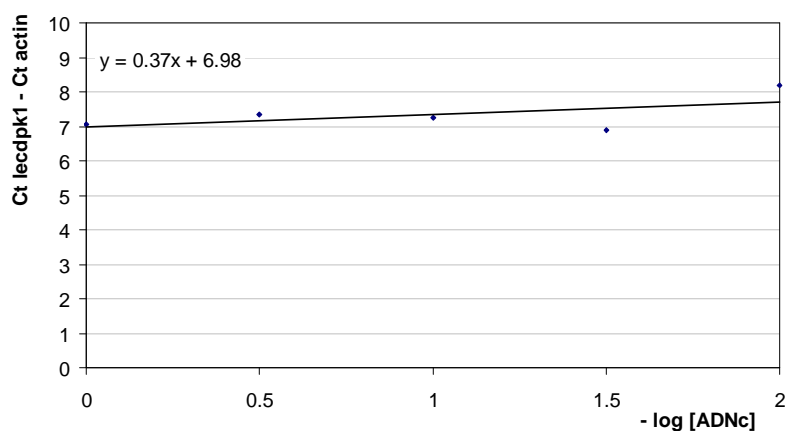
PCR. Faire une PCRq classique à une T° compatible pour les deux couples d'amorces testés.

Graphique.

- Récupérer les valeurs de Ct
- Calculer des ΔCt tels que $\Delta Ct = Ct \text{ marqueur test} - Ct \text{ marqueur témoins (actin)}$
- Tracer la droite $\Delta Ct = f(-\log C)$.
- Afficher la droite de tendance et son équation.

Exemple :

Ct lecdpk1 - Ct actin	(-log C)
7,05	0
7,35	0,5
7,25	1
6,90	1,5
8,20	2



Analyse. Vérifier que la pente de cette droite est nulle avec un test de pente (cf. page suivante).

Test d'efficacité d'amplification (2/2) - Analyse

But. Vérifier qu'une pente de droite est nulle (test statistique, Student).

Hypothèse.

La pente « a » de la droite d'équation $y = ax + b$ est nulle.

L'hypothèse est acceptée ssi $-t_{théo} < t_{obs} < +t_{théo}$.

Calcul de la valeur théorique ($t_{théo}$).

Valeur d'une variable aléatoire pour une probabilité donnée selon la loi de Student. (Récupérer la valeur sous Excel pour la loi de Student inverse).

Probabilité : **5 %** et degrés de liberté = **3** (effectif-2) -> **$t_{théo} = 3.18$** .

Calcul de la valeur observée (t_{obs}).

(à partir de l'exemple précédent)

x	y	\hat{y}	$(y - \hat{y})^2$	$t_{obs} = \frac{ \text{pente} - 0 }{\sqrt{\frac{SCER}{(n-2) SCE X}}}$
0,00	7,05	7,98	0,0049	
0,50	7,35	7,17	0,0342	$t_{obs} = \frac{ 0,37 - 0 }{\sqrt{\frac{0,68}{(3) 2,50}}}$
1,00	7,25	7,35	0,0100	
1,50	6,90	7,54	0,4032	$t_{obs} = 1,23$
2,00	8,20	7,72	0,2304	
2,50			0,68	
SCE X			SCER	

\hat{y} : valeur y obtenue via l'équation de la droite ($0,37 X + 6,98$) pour chaque valeur de X.

SCE X : somme des carrés des écarts à X

SCER : somme des carrés des écarts résiduels

Conclusion.

- $3,18 < 1,23 < 3,18$, --> l'hypothèse de pente nulle est vérifiée.

Conclusion générale : les deux couples d'amorces utilisés ont des efficacités d'amplification équivalentes et peuvent être utilisés simultanément en PCRq. La méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ peut s'appliquer.

Annexe 8 : protocole d'extraction et de dosage des nucléotides libres.

Extraction et dosage des nucléotides libres

Extraction :

- Broyer les tissus dans l'azote liquide (au mortier)
- Ajouter 500 µl d'acide perchlorique (HClO_4 - 0,5 M)
- Agiter (vortex)
- Centrifuger 10 minutes à 10000 g
- Neutraliser le pH du surnageant en ajoutant du bicarbonate de potassium (CHKO_3 - 0,5 M)
- Contrôler la neutralité avec du papier pH.
- Centrifuger 5 minutes à 10000g
- Aliquoter le surnageant par 50 µl
- Le culot pourra servir au dosage des protéines
- Conservation à - 20°C

Dosage (pour 4 plaques PCR, soit 24+4 échantillons par solution) :

Le dosage de l'ADP et AMP se fait indirectement par le dosage de l'ATP au cours de réactions enzymatiques. Quatre solutions mères sont à préparer :

(Volume final: 5,7 ml)	réaction I	réaction II	réaction III	réaction IV
H2O	2,7 ml	2,7 ml	2,7 ml	2,4 ml
PEP (0,15mM)	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
PK	*	1 µl = 11,7 u	1 µl = 11,7 u	*
MK	*	*	1 µl = 4,7 u	*
ATP (1 pmol/µl)	*	*	*	0,3 ml

(PEP : phospho-enol-pyruvate ; PK : pyruvate kinase ; MK : myokinase)

Dans chaque puits, déposer manuellement :

- 10 µl d'extrait
- 50 µl de solution mère (I, II, III ou IV)

Faire déposer automatiquement par le luminomètre :

- 40 µl de tampon luciférine / luciférase (bioluminescence assay kit cls II, ROCHE)
- Volume final : 100 µl (l'extrait est dilué 10 fois)

Organisation d'une plaque 96 puits :

Deux séries (R, 15, 30 60) peuvent être dosées (a, b et c : échantillons déposés en triplicata)

			Solution I			Solution II			Solution III			Solution IV		
			a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Série 1	T	A												
	15	B												
	30	C												
	60	D												
Série 2	T	E												
	15	F												
	30	G												
	60	H												

Dosage de l'ATP :

- Préparer une droite étalon pour des concentrations en ATP de 10^{-5} à 10^{-11} M.
- Doser les protéines présentes dans les culots de l'extraction.
- La réaction I permet d'obtenir la concentration en ATP des échantillons.
- La soustraction Réaction 2 - Réaction 1 donne la concentration en ADP.
- La soustraction Réaction 3 - Réaction 2 donne la concentration en AMP.
- La réaction IV sert de contrôle interne.

Calcul de la charge énergétique adénylique :

$$\text{CEA} = (\text{ATP} + \frac{1}{2} \text{ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$$

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ::

- 1999/5/CE : directive 1999/5/CE du Parlement Européen et du Conseil du 9 mars 1999 concernant les équipements hertziens et les équipements terminaux de télécommunications et la reconnaissance mutuelle de leur conformité.
- 2002-775 : décret n° 2002-775 du 3 mai 2002 pris en application du 12° de l'article L. 32 du code des postes et télécommunications et relatif aux valeurs limites d'exposition du public aux champs électromagnétiques émis par les équipements utilisés dans les réseaux de télécommunication ou par les installations radioélectriques. Journal Officiel n° 105 du 5 mai 2002 page 8624, texte n° 39.
- Adair RK (2003) Biophysical Limits on Athermal Effects of RF and Microwave Radiation. *Bioelectromagnetics*. 24:39-48.
- AFOM (Association française des Opérateurs Mobiles, 2007) La téléphonie mobile en France, faits et chiffres 2006. [www.afom.fr].
- AFSSE (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement, 2005) Téléphonie mobile & santé. Avis de l'Afsse sur la téléphonie mobile, Maisons-Alfort. [www.afsse.fr].
- AFSSE² (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement, 2005) Téléphonie mobile & santé. Rapport du groupe d'experts, Edition 2004-2005. Maisons-Alfort. [www.afsse.fr].
- Ahlbom A, Green A, Kheifets L, Savitz 4, Swerdlow A (2004) Epidemiology of Health Effects of Radiofrequency Exposure. *Environmental Health Perspectives*. 112(17):1742-1754.
- Alborn HT, Turlings TCJ, Jones TH, Stenhagen G, Loughrin JH, Tumlinson JH (1997) An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*. 276:945-949.
- Aldinucci C, Garcia JB, Palmi M, Sgaragli G, Benocci A, Meini A, Pessina F, Rossi C, Bonechi C, Pessina GP (2003) The effect of exposure to high flux density static and pulsed magnetic fields on lymphocyte function. *Bioelectromagnetics*. 24:373-379.
- Alexandre J, Lassalles JP (1991) Hydrostatic and osmotic pressure activated channel in plant vacuole. *Biophysical Journal*. 60(6):1326-1336.
- Alexandre J, Lassalles JP, Kado RT (1990) Opening of Ca²⁺ channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature*. 343:567-570.
- ANFR (Agence Nationale des Fréquences, 2004) Panorama du rayonnement électromagnétique en France. État des lieux en 2004 et principe de précaution. [www.anfr.fr].
- Ardoino L, Barbieri E, Vecchia P (2004) Determinants of exposure to electromagnetic fields from mobile phones. *Radiation Protection Dosimetry*. 111(4):403-406.
- Arocho A, Chen B, Ladanyi M, Pan Q (2006) Validation of the 2-DeltaDeltaCt Calculation as an Alternate Method of Data Analysis for Quantitative PCR of BCR-ABL P210 Transcripts. *Diagnostic Molecular Pathology*. 15(1):56-61.
- Astumian R (2003) Adiabatic pumping mechanism for ion motive ATPases. *Physical Review Letters*. 91(118192):1-4.
- Atkinson DE (1968) The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*. 7(11):4030-4.
- Auvinen A, Toivo T, Tokola K (2006) Epidemiological risk assessment of mobile phones and cancer: where can we improve ? *European Journal of Cancer Prevention*. 15(6):516-23.
- Ballester M, Castelló A, Ibáñez E, Sánchez A, Folch JM (2004) Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *Biotechniques*. 37(4):610-613.
- Bamiou DE, Ceranic B, Cox R, Watt H, Chadwick P, Luxon LM (2007) Mobile telephone use effects on peripheral audiovestibular function: A case-control study. *Bioelectromagnetics*. DOI: 10.1002/bem.20369.
- Baudenbacher F, Fong LE, Thiel G, Wacke M, Jazbinsek V, Holzer JR, Stampfl A, Trontelj Z (2005) Intracellular axial current in *Chara corallina* reflects the altered kinetics of ions in cytoplasm under the influence of light. *Biophysical Journal*. 88:690-697.

- Beaubois E, Girard S, Lallechere S, Davies E, Paladian F, Bonnet P, Ledoigt G, Vian A (2007) Intercellular communication in plants: evidence for two rapidly systemic signals generated in response to electromagnetic field stimulation in tomato. *Plant, Cell and Environment*. 30:834-844.
- Bergey DR, Ryan CA (1999) Wound- and systemin inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Molecular Biology*. 40:815-823.
- Blank M, Goodman R (2004) A biological guide for electromagnetic safety: The stress response. *Bioelectromagnetics*. 25:642-6.
- Blokhina O, Virolainen E et Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany*. 91(2):179-194.
- Bonnet P, Vian A, Beaubois E, Faure C, Paladian F (2006) Plants as Living Antennas ? Proceedings of the European Conference on Antennas and Propagation: EuCAP 2006 (ESA SP-626). 6-10, Nice, France. Editors: H. Lacoste & L. Ouwehand.
- Bowles DJ (1995) Signal transduction in plants. *Trends in Cell Biology*. 5:404-8.
- Bowles DJ (1998) Signal transduction in the wound response of tomato plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society. Series B, Biological sciences*. 353(1374):1495-510.
- Braam J (2005) In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist*. 165(2):373-389.
- Cardis E, Richardson L, Deltour I, Armstrong B, Feychting M, Johansen C, Kilkeny M, McKinney P, Modan B, Sadetzki S, Schüz J, Swerdlow A, Vrijheid M, Auvinen A, Berg G, Blettner M, Bowman J, Brown J, Chetrit A, Christensen HC, Cook A, Hepworth S, Giles G, Hours M, Iavarone I, Jarus-Hakak A, Klaeboe L, Krewski D, Lagorio S, Lönn S, Mann S, McBride M, Muir K, Nadon L, Parent ME, Pearce N, Salminen T, Schoemaker M, Schlehofer B, Siemiatycki J, Taki M, Takebayashi T, Tynes T, van Tongeren M, Vecchia P, Wiart J, Woodward A, Yamaguchi N (2007) The INTERPHONE study: design, epidemiological methods, and description of the study population. *European Journal of Epidemiology*. 22(9):647-664.
- Castillo MC, Martinez C, Buchala A, Métraux JP, León J (2004) Gene-specific involvement of β -oxidation in wound activated responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 135:85-94.
- CENELEC (Comité Européen de Normalisation Electrotechnique, 2001) Norme de base relative à la mesure du Débit d'Absorption Spécifique relatif à l'exposition des personnes aux champs électromagnétiques émis par les téléphones mobiles (300 MHz - 3 GHz) - EN 50361:2001.
- CENELEC² (Comité Européen de Normalisation Electrotechnique, 2001) Norme de produit pour la mesure de conformité des téléphones mobiles aux restrictions de base relatives à l'exposition des personnes aux champs électromagnétiques (300 MHz - 3 GHz) - EN 50360:2001.
- Challis LJ (2005) Mechanisms for interaction between RF fields and biological tissues. *Bioelectromagnetics supplement*. 26:S98-106.
- Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J (2002) Calcium Signaling through Protein Kinases. The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family. *Plant Physiology*. 129:469-485.
- Chico JM, Raíces M, Téllez-Iñón MT, Ulloa RM (2002) A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant Physiology*. 128:256-270.
- Chomczynski P, Sacchi, N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162:156-159.
- Clarkson DT, Brownlee C, Ayling SM (1988) Cytoplasmic calcium measurements in intact higher plant cells: results from fluorescence ration imaging of Fura-2. *Journal of Cell Science*. 91:71-80.

- Coker JS, Vian A, Davies E (2005) Identification, accumulation, and functional prediction of novel tomato transcripts systemically upregulated after fire damage. *Physiologia Plantarum*. 124(3):311-322.
- Colcombet J, Lelièvre F, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Frachisse JM (2005) Distinct pH regulation of slow and rapid anion channels at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* hypocotyl cells. *Journal of Experimental Botany*. 56(417):1897-1903.
- Cosgrove DJ, Hedrich R (1991) Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta*. 186(1):143-153.
- Cotgreave IA (2005) Biological stress responses to radio frequency electromagnetic radiation: are mobile phones really so (heat) shocking? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 435(1):227-40.
- Coulon C, Blanchard JM (2001) Flux calciques et expression génique. *Médecine Sciences*. 17:969-78.
- Dammann C, Rojo E, Sánchez-Serrano JJ (1997) Abscissic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. *Plant Journal*. 11:773-782.
- D'Andrea JA, Adair ER, de Lorge JO (2003) Behavioral and cognitive effects of microwave exposure. *Bioelectromagnetics Supplement*. 6:39-62.
- Dasdag S, Akdag MZ, Ulukaya E, Uzunlar AK, Yegin D (2008) Mobile phone exposure does not induce apoptosis on spermatogenesis in rats. *Archives of Medical Research*. 39(1):40-44.
- Davies E (2006) Electrical signals in plants: facts and hypotheses. In: *Plant Electrophysiology - Theory and Methods*. AG Volkov (ed) Springer, Berlin. pp. 407-422.
- Davies E, Abe S (1995) Methods for isolation and analysis of polyribosomes. In: *Methods in Cell Biology*. 50:209-222. Academic Press.
- Davies E, Larkins BA (1980) Ribosomes. In: *Plant Biochemistry: A comprehensive treatise*. Vol. I. pp. 413-435.
- Davies E, Schuster A (1981) Intercellular communication in plants: Evidence for a rapidly-generated, bidirectionally-transmitted wound signal. *PNAS*. 78:2422-2426.
- Davies E, Stankovic B (2006) Electrical signals, the cytoskeleton, and gene expression: current hypotheses. In *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life*. (Baluska F, Mancuso S & Dieter V, eds), pp. 309-20. Springer-Verlag, Berlin.
- Davies E, Vian A, Henry-Vian C, Stankovic B (1997) Rapid systemic up-regulation of genes after heat- wounding and electrical stimulation. *Acta Physiologiae Plantarum*. 19/571-576.
- Demidchik V, Nichols C, Oliynyk M, Dark A, Glover BJ, Davies JM (2003) Is ATP a signaling agent in plants ? *Plant Physiology*. 133:456-461.
- Depège N, Thonat C, Coutand C, Julien JL, Boyer N (1997) Morphological responses and molecular modifications in tomato plants after mechanical stimulation. *Plant and Cell Physiology*. 38(10):1127-1134.
- Diem E, Schwarz C, Adlkofer F, Jahn O, Rüdiger H (2005) Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro. *Mutation Research*. 583:178-183.
- Dobrota C (2006) Energy dependant plant stress acclimation. *Reviews in Environmental Science and Bio Technology*. 5(2-3):243-251.
- Ellingsrud S, Johnsson A (1993) Perturbations of plant leaflet rhythms caused by electromagnetic radio-frequency radiation. *Bioelectromagnetics*. 14(3):257-271.
- Elwood JM (2003) Epidemiological studies of radio frequency exposures and human cancer. *Bioelectromagnetics*. 24(S6):S63-S73.
- Feychting M, Ahlbom A, Kheifets L (2005) EMF and health. *Annual Review of Public Health*. 26:165-89.

- Ferguson IB (2004) The plant response: stress in the daily environment. *Journal of Zhejiang University Science*. 5:129-132.
- Fisahn J, Herde O, Willmitzer L, Peña-Cortés H (2004) Analysis of the Transient Increase in Cytosolic Ca²⁺ during the Action Potential of Higher Plants with High Temporal Resolution: Requirement of Ca²⁺ Transients for Induction of Jasmonic Acid Biosynthesis and PINII Gene Expression. *Plant and Cell Physiology*. 45(4):456-459.
- Foster KR, Repacholi MH (2004) Biological effects of radiofrequency fields: does modulation matter? *Radiation. Research*. 162(2):219-25.
- Galland P, Pazur A (2005) Magnetoreception in plants. *J. Plant. Res*. 118:371-389.
- Galvanovskis J, Sandblom J (1997) Amplification of electromagnetic signals by ion channels. *Biophysical Journal*. 73:3056-3065.
- Gates T, Bonner J (1959) The response of the young tomato plant to a brief period of water shortage. IV. Effects of water stress on the ribonucleic acid metabolism of tomato leaves. *Plant Physiology*. 34(1):49-55.
- Gilroy S, Bethke PC, Jones RL (1993) Calcium homeostasis in plants. *Journal of Cell Science*. 106:453-462.
- Goodman R, Blank M. (2002) Insights into electromagnetic interaction mechanisms. *Journal of Cell Physiology*. 192(1):16-22.
- Gout E, Bligny R, Doucet R (1992) Regulation of intracellular pH values in higher plants. Carbon-13 and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. *Journal of Biological Chemistry*. 267:13903-13909.
- Green TR, Ryan CA (1972) Wound inducible proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*. 175:776-777.
- Harmon AC (2003) Calcium-regulated protein kinases of plants. *Gravity & Space Biology Bulletin*. 16(2):83-90.
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF (2000) CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal ? *Trends in Plant Science*. 5(4):154-159.
- Harper JF (2001) Dissecting calcium oscillators in plant cells. *Trends in Plant Science*. 6(9):395-397.
- Harper JF, Breton G, Harmon A (2004) Decoding Ca²⁺ signals through plant protein kinases. *Annual Review of Plant Biology*. 55:263-288.
- Henry-Vian C, Vian A, Dietrich A, Ledoigt G, Desbiez MO (1995) Changes in the polysomal mRNA population upon wound signal expression or storage in *Bidens pilosa*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 33:337-344.
- Henry-Vian C, Vian A, Ledoigt G, Desbiez MO (1996) Effect of wounding on nucleotide pools in *Bidens pilosa* L. *Biologia Plantarum*. 38(2):191-196.
- Herde O, Peña-Cortés H, Wasternack C, Willmitzer L, Fisahn J (1999) Electric signaling and Pin2 gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiology*. 119:213-218.
- Heytler PG (1963) Uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanide phenylhydrazones. I. Some characteristics of m-Cl-CCP action on mitochondria and chloroplasts. *Biochemistry*. 2:357-61.
- Hopkins WG (1998) *Introduction to Plant Physiology* (Sec. Ed.) J Wiley & Son, Inc.
- Hours M, Bernard M, Montestrucq L, Arslan M, Bergeret A, Deltour I, Cardis E (2007) Cell Phones and Risk of brain and acoustic nerve tumours: the French INTERPHONE case-control study. *Revue Epidémiologique et Santé Publique*. 55(5):321-332.
- ICNIRP (Commission Internationale de Protection contre les Rayonnements Non Ionisants, 1998) Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). *Health Physics*. 74(4):494-522.
- IEC SC 77B, IEC 61000-4-21 and CISPR/A (2003) *Electromagnetic Compatibility (EMC) Part 4-21: Testing and Measurement Techniques – Reverberation Chamber Test Methods*. International Electrotechnical Commission (IEC) International standard.
- Jaton M, Roubaty C (2002) *Modulations 213-232, Tcom - Ceivd Télécommunications*.

- Jeter CR, Roux SJ (2006) Plant responses to extracellular nucleotides: Cellular processes and biological effects. *Purinergic Signal*. 2:443-449.
- Jeter CR, Tang W, Henaff E, Butterfield T & Roux SJ (2004) Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16:2652-2664.
- Keppler D, Rudigier J, Decker K (1970) Enzymic determination of uracil nucleotides in tissues. *Analytical Biochemistry*. 38:105-114.
- Kheifets L, Shimkhada R (2005) Childhood Leukemia and EMF: Review of the Epidemiologic Evidence. *Bioelectromagnetics Supplement*. 7:S51-S59.
- Kim SY, Sigaguru M, Stacey G (2006) Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiology*. 142:984-92.
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch, coldshock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*. 352:524-526.
- Knight MR, Read ND, Campbell AK, Trewavas AJ (1993) Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins. *Journal of Cell Biology*. 121:83-90.
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1996) Cold calcium signalling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*. 8:489-503.
- Kohane MJ, Tiller WA (2000) Energy, Fitness, and Information-Augmented Electromagnetic Fields in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Scientific Exploration*. 14(2):217-231.
- Kundi M (2004) Mobile phone use and cancer. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 61:560-570.
- Kundi M, Mild K, Hardell L, Mattsson MO (2004) Mobile telephones and cancer - a review of epidemiological evidence. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*. 7(5):351-84.
- Kuo A, Cappelluti S, Cervantes-Cervantes M, Rodrigue M, Bush DS (1996) Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *The Plant Cell*. 8(2):259-269.
- A Kurkdjian A, Guern J (1989) Intracellular pH: Measurement and importance in cell activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 40:271-303.
- Lacy Hulbert A, Metcalfe JC, Hesketh R (1998) Biological responses to electromagnetic fields. *Faseb Journal*. 12:395-420.
- Lebrasseur ND, MacIntosh GC, Pérez-Amador MA, Saitoh M, Green PM (2002) Local and systemic wound-induction of RNase and nuclease activities in *Arabidopsis*: RNS1 as a marker for a JA-independent systemic signaling pathway. *Plant Journal*. 29:393-403.
- Leclercq J, Ranty B, Sanchez-Ballesta MT, Li Z, Jones B, Jauneau A, Pech JC, Latché A, Ranjeva R, Bouzayen M (2005) Molecular and biochemical characterization of LeCRK1, a ripening-associated tomato CDPK-related kinase. *Journal of Experimental Botany*. 56(409):25-35.
- Leitner-Dagan Y, Weiss D (1999) Ca^{2+} , calmodulin, and protein dephosphorylation are required for GA-induced gene expression in petunia corolla. *Physiologia Plantarum*. 105:116-221.
- León J, Rojo E, Sánchez-Serrano JJ (2001) Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*. 52(354):1-9.
- Leszczynski D, Joenvaara S, Reivinen J, Kuokka R (2002) Non-thermal activation of hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: Molecular mechanism for cancer and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation*. 70(2/3):120-129.
- Levin M (2003) Bioelectromagnetics in morphogenesis. *Bioelectromagnetics* 24:295-315.

- Li BF, Guo GZ, Ren DQ, Jing-Li , Zhang RB (2007) Electromagnetic pulses induce fluctuations in blood pressure in rats. *International Journal of Radiation Biology*. 83(6):421-429.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 25, 402-408.
- Lixia S, Yao K, Kaijun W, Deqiang L, Huajun H, Xiangwei G, Baohong W, Wei Z, Jianling L, Wei W (2006) Effects of 1.8 GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells. *Mutation Research*. 602(1-2):135-42.
- Luben RA (1991) Effects of low-energy electromagnetic fields (pulsed and DC) on membrane signal transduction processes in biological system, *Health Physics*. 61:15-28.
- Ludwig AA, Romeis T, Jones JDG (2004) CDPK-mediated signalling pathways: specificity and crosstalk. *Journal of Experimental Botany*. 55:181-188.
- Magras IN, Xenos TD (1997) RF radiation-induced changes in the prenatal development of mice. *Bioelectromagnetics*. 18(6):455-61.
- Malek K, Dietrich RA (1999) How do plants cope with diverse enemies ? *Trends in Plant Science*. 4(6):1360-1385.
- Marinelli F, La Sala D, Ciccotti G, Cattini L, Trimarchi C, Putti S, Zamparelli A, Giuliani L, Tomassetti G, Cinti C (2004) Exposure to 900 MHz electromagnetic field induces an unbalance between pro-apoptotic and pro-survival signals in T-lymphoblastoid leukemia CCRF-CEM cells. *Journal of Cellular Physiology*. 198(2):324-332.
- Masuda H, Ushiyama A, Hirota S, Wake K, Watanabe S, Yamanaka Y, Taki M, Ohkubo C. (2007) Effects of acute exposure to a 1439 MHz electromagnetic field on the microcirculatory parameters in rat brain. *In Vivo*. 21(4):555-562.
- Medvedev SS (2005) Calcium signaling system in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 52(2):249-270.
- Meltz ML (2003) Radiofrequency exposure and mammalian cell toxicity, genotoxicity, and transformation. *Bioelectromagnetics Supplement*. (24)6:196-213.
- Miller JH, Nawarathna D, Vajrara V, Gardner J, Widger WR (2005) Electromagnetic probes of molecular motors in the electron transport chains of mitochondria and chloroplasts. *Journal of Physics*. 131:363-366.
- Ministère de la Santé (2001) Les téléphones mobiles, leurs stations de base et la santé, Etat des connaissances et recommandations, Rapport au Directeur Général de la Santé. [www.sante.gouv.fr].
- Moal J, Le Coz JR, Samain JF, Daniel JY, Bodoy A (1991) Oyster adenylate energy charge: response to levels of food. *Aquatic Living Resources*. 4:133-138.
- Nagata T, Iizumi S, Satoh K, Ooka H, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Kikuchi S (2004) Comparative analysis of plant and animal calcium signal transduction element using plant full-length cDNA data. *Molecular Biology and Evolution*. 21(10):1855-70.
- Nayyar H (2003) Calcium as environmental sensor in plants. *Current Science*. 84:893-902.
- Nittby H, Grafström G, Tian DP, Malmgren L, Brun A, Persson BR, Salford LG, Eberhardt J. (2007) Cognitive impairment in rats after long-term exposure to GSM-900 mobile phone radiation. *Bioelectromagnetics*. DOI: 10.1002/bem.20386.
- Nylund R, Leszczynski D (2006) Mobile phone radiation causes changes in gene and protein expression in human endothelial cell lines and the response seems to be genome- and proteome-dependent. *Proteomics*. 6(17):4769-4780.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé, 2000) Fact sheet N°193, Electromagnetic fields and public health: mobile telephones and their base stations. [www.who.int].
- Orendáčová J, Orendáč M, Raceková E, Marsala J (2007) Neurobiological effects of microwave exposure: a review focused on morphological findings in experimental animals. *Archives Italiennes de Biologie*. 145(1):1-12.
- Otterskog M, Madsén K (2003) Cell phone performance testing and propagation environment modelling in a Reverberation Chamber. The 2003 Reverberation Chamber, Anechoic Chamber and OATS Users Meeting, Austin (Texas).

- Paniagua JM, Jiménez A, Rufo M, Gutiérrez JsA, Gómez FJ Antolín A (2006) Exposure to extremely low frequency magnetic fields in an urban area. *Radiation and Environmental Biophysics*. 46(1):69-76.
- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*. 253:895-898.
- Peña Cortés H, Fisahn J, Willmitzer L (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 92:4106-13.
- Perera IY, Hung CY, Brady S, Muday GK, Boss WF (2006) A Universal Role for Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Mediated Signaling in Plant Gravitropism. *Plant Physiology*. 140(2):746-760.
- Piacentini M, Piatti E, Fraternale D, Ricci D, Albertini MC, Accorsi A (2004) Phospholipase C-dependent phosphoinositide breakdown induced by ELF-EMF in *Peganum harmala calli*. *Biochimie*. 86:343-349.
- Pradet A. (1967) Study of adenosine-5'-mono, di and tri-phosphates in plant tissues. I. Enzymatic measurement. *Physiologie Végétale*. 5:209-221.
- Ray S, Agarwal P, Arora R, Kapoor S, Tyagi AK (2007) Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Molecular Genetics and Genomics*. DOI-10.1007/s00438-007-0267-4.
- REFLEX (2004) Risk evaluation of potential environmental hazards from low frequency electromagnetic field exposure using sensitive in vitro methods. Quality of life and management of living resources. Key Action 4 "Environment and Health". European Union. Final report.
- Remondini D, Nylund R, Reivinen J, Poullietier de Gannes F, Veyret B, Lagroye I, Haro E, Trillo MA, Capri M, Franceschi C, Schlatterer K, Gminski R, Fitzner R, Tauber R, Schuderer J, Kuster N, Leszczynski D, Bersani F, Maercker C (2006) Gene expression changes in human cells after exposure to mobile phone microwaves. *Proteomics*. 6(17):4745-4754.
- Repacholi MH, Greenbaum B (1999) Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: Health effects and research needs. *Bioelectromagnetics*. 20:133-160.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 12:707-719.
- Robin P (1998) Horticulture sans sol : histoire et actualité. *Cahiers d'économie et sociologie rurales*, INRA. 46-47:98-130.
- Roux S, Steinebrunner I (2007) Extracellular ATP: an unexpected role as a signaller in plants. *Trends in Plant Science*. 12:522-527.
- Roy CR (2007) Reporter Report: ICNIRP international workshop on EMF dosimetry and biophysical aspects relevant to setting exposure guidelines. *Health Physics*. 92(6):658-67.
- Ryan CA (1968) An inducible protein in potato and tomato leaflets. *Plant Physiology*. 43:1880-1881.
- Salford LG, Brun A, Stureson K, Eberhardt JL, Persson BR (1994) Permeability of the Blood-brain Barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50 and 200 Hz. *Microscopy Research and Technique*. 27(6):535-542.
- Sanchez S, Masuda H, Ruffié G, De Gannes FP, Billaudel B, Haro E, Lévêque P, Lagroye I, Veyret B (2008) Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. III: Expression of heat shock proteins. *International Journal of Radiation Biology*. *International Journal of Radiation Biology*. 84:61-68.

- Sanders AP, Joines WT, Allis JW (1984) Effects of continuous-wave, pulsed, and sinusoidal-amplitude-modulated microwaves on brain energy metabolism. *Bioelectromagnetics*. 6(1):89-97.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002) Calcium at the crossroads of Signaling. *The Plant Cell*. 14, S401-S417.
- Sandu DD, Goiceanu IC, Ispas A, Creanga I, Miclaus S, Creanga DE (2005) A preliminary study on ultra high frequency electromagnetic fields effect on black locust chlorophylls. *Acta Biologica Hungarica*. 56(1-2):109-117.
- Sathyanarayanan PV, Poovaiah BW (2004) Decoding Ca²⁺ signals in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 23(1):1-11.
- Schmutz P, Siegenthaler J, Stager C, Tarjan D, Bucher JB (1996) Long-term exposure of young spruce and beech trees to 2450-MHz microwave radiation. *Science of the Total Environment*. 180(1-2):43-48.
- Selga T, Selga M (1996) Response of *Pinus sylvestris* L. needles to electromagnetic fields. Cytological and ultrastructural aspects. *Science of the Total Environment*. 180(1):65-73.
- Shiina T, Nishii A, Toyoshima Y, Bogorad L (1997) Identification of promoter elements involved in the cytosolic Ca²⁺ mediated photoregulation of maize cab-m1 expression. *Plant Physiology*. 115:477-483.
- Snedden WA, Fromm H (1998) Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Science*. 3(8):299-304.
- Sommer AM, Bitz AK, Streckert J, Hansen VW, Lerchl A (2007) Lymphoma development in mice chronically exposed to UMTS-modulated radiofrequency electromagnetic fields. *Radiation Research*. 168(1):72-80.
- Song Q, Xi G, Yang C, Cao Y (2004) Effect of low level radio frequency electromagnetic field on chlorophyll fluorescence dynamics process in photosynthesis cell of soybean and banana. *Journal of South China Agricultural University*. 25(4):67-70.
- Stankiewicz W, Dabrowski MP, Kubacki R, Sobiczewska E, Szmigielski S (2006) Immunotropic influence of 900 MHz microwave GSM signal on human blood immune cells activated in vitro. *Electromagnetic Biology and Medicine*. 25(1):45-51.
- Stankovic B, Davies E (1996) Both action potential and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato. *FEBS Letters*. 390:275-279.
- Stankovic B, Davies E (1997) Intercellular communication in plants: electrical stimulation of proteinase inhibitor gene expression in tomato. *Planta*. 202:402-406.
- Stankovic B, Vian A, Henry-Vian C, Davies E (2000) Molecular cloning and characterization of a tomato cDNA encoding a systemically wound-inducible bZIP DNA-Binding protein. *Planta*. 212:60-66.
- Stašelis, A., Duchovskis, P., Brazaityte, A (2004) Impact of electromagnetic fields on morphogenesis and physiological indices of tomato. *International Agrophysics*. 18(3):277-283.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR (2002) Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*. 29(2):332-337.
- Sylvestre C, Batrel Y, Le Gal Y (1986) La détection des effets sublétaux des pollutions : utilisation in situ d'un indice biochimique, la charge énergétique. IFREMER. Actes de Colloques n° 4:391 à 396.
- Tafforeau M, Verdus MC, Norris V, White G, Demarty M, Thellier M, Ripoll C (2002) SIMS study of the calcium-deprivation step related to epidermal meristem production induced in flax by cold shock or radiation from a GSM telephone. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*. 20:611-23.
- Tafforeau M, Verdus MC, Norris V, White GJ, Cole M, Demarty M, Thellier M, Ripoll C (2004) Plant sensitivity to low intensity 105 GHz electromagnetic radiation. *Bioelectromagnetics*. 25(6):403-407.
- Tahvanainen K, Nino J, Halonen P, Kuusela T, Laitinen T, Lansimies E, Hartikainen J, Hietanen M, Lindholm H (2004) Cellular phone use does not acutely affect blood pressure or heart rate of humans. *Bioelectromagnetics*. 25:73-83.

- Telewski FW (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany*. 93:1466-1476.
- Thain JF, Gubb IR, Wildon DC (1995) Depolarization of tomato leaf cells by oligogalacturonide elicitors. *Plant, Cell and Environment*. 18:211-214.
- Thompson DS (2005) How do cell walls regulate plant growth? *Journal of Experimental Botany*. 56(419):2275-2285.
- Thuleau P, Ward JM, Ranjeva R, Schroeder JI (1994) Voltage dependent calcium-permeable channels in the plasma membrane of a higher plant cell. *EMBO Journal*. 13:2970-2975.
- Tillmann T, Buschmann J (2003) In vivo studies on possible effects of radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF), especially as used by mobile radio. Edition Wissenschaft. Forschungsgemeinschaft Funk e.V. G 14515. issue n°19.
- Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* : Relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*. 85:389-398.
- Tkalec M, Malarić K, Pevalek-Kozlina B (2007) Exposure to radiofrequency radiation induces oxidative stress in duckweed *Lemna minor* L. *Science of the Total Environment*. 388(1-3):78-89.
- Trewavas A (1999) Le Calcium, C'est la Vie: Calcium Makes Waves. *Plant Physiology*. 120:1-6.
- Trewavas A (2000) Signal Perception and Transduction. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan B, Gruissem W, Jones R (Eds) American Society of Plant Physiologists. pp.930-987.
- Trewavas A (2002) Plant Cell Signal Transduction. The Emerging Phenotype. *The Plant Cell*. 14(Supp.):s3-s4.
- Trewavas A, Gilroy S (1991). Signal transduction in plant cells. *Trends in Genetics*. 7(11-12):356-361.
- Valberg PA, van Deventer E, Repacholi MH (2007) Workgroup Report: Base Stations and Wireless Networks—Radiofrequency (RF) Exposures and Health Consequences. *Environmental Health Perspectives*. 115(3):416-424.
- Vian A, Davies E (2006) Two different wound signals evoke very rapid, systemic CMBP transcript accumulation in tomato. *Plant Signaling & Behavior*. 1:261-264.
- Vian A, Henry-Vian C, Davies E (1999) Rapid and systemic accumulation of Chloroplast mRNA Binding protein transcript after flame stimulus in tomato. *Plant Physiology*. 121:517-524.
- Vian A, Henry-Vian C, Schantz R, Ledoigt G, Frachisse JM, Desbiez MO, Julien JL (1996) Is membrane potential involved in calmodulin gene expression after external stimulation in plants ? *FEBS letters*. 380:93-96.
- Vian A, Henry-Vian C, Schantz R, Schantz ML, Davies E, Ledoigt G, Desbiez MO (1997) Effect of calcium and calcium-counteracting drugs on the response of *Bidens pilosa* L. to wounding. *Plant Cell Physiology*. 38:751-753.
- Vian A, Roux D, Girard S, Bonnet P, Paladian F, Davies E, Ledoigt G (2006) Microwave irradiation affects gene expression in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 1:67-70.
- Wang J, Koyama S, Komatsubara Y, Suzuki Y, Taki M, Miyakoshi J (2006) Effects of a 2450 MHz High-Frequency Electromagnetic Field With a Wide Range of SARs on the Induction of Heat-Shock Proteins in A172 Cells. *Bioelectromagnetics*. 27:479-486.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*. 9(5):244-252.
- Wang X, Wang C, Sang Y, Qin C, Welti R (2002) Networking of phospholipases in plant signal transduction. *Physiologia Plantarum*. 115(3):331-335.
- Westerman R, Hocking B (2004) Diseases of modern living: neurological changes associated with mobile phones and radiofrequency radiation in humans. *Neuroscience Letters*. 361:13-16.

- Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb IR, Reilly AJ, Skipper YD, Doherty HM, O'Donnell PJ, Bowles DJ (1992) Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature*. 360:62-65.
- Wilén J, Sandström M, Mild KH (2003) Subjective symptoms among mobile phone users – A consequence of absorption of radiofrequency fields ? *Bioelectromagnetics*. 24(3):152-159.
- Wirth D, Christians ES, Drion PV, Dessy-Doize C, Gsutin P (2003) Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 147:127-144.
- Wood AW (2006) How dangerous are mobile phones, transmission masts, and electricity pylons ? *Archives of Disease in Childhood*. 91(4):361-366.
- Yakimova ET, Kapchina-Toteva VM, Woltering EJ (2007) Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells. *Journal of Plant Physiology*. 164(6):702-708.
- Yan JG, Agresti M, Bruce T, Yan YH, Granlund A, Matloub HS (2007) Effects of cellular phone emissions on sperm motility in rats. *Fertility and Sterility*. 88(4):957-964.
- Yang T, Poovaiah BW (2003) Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science*. 8:505-512.
- Yurekli AI, Ozkan M, Kalkan T, Saybasili H, Tuncel H, Atukeren P, Gumustas K, Seker S (2006) GSM base station electromagnetic radiation and oxidative stress in rats. *Electromagnetic Biology and Medicine*. 25(3):177-188.
- Zhang HY, Xie XZ, Xu YZ, Wu NH (2004) Isolation and functional assessment of a tomato proteinase inhibitor II gene. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42:437-444.
- Zhao R, Zhang S, Xu Z, Ju L, Lu D, Yao G (2007) Studying gene expression profile of rat neuron exposed to 1800MHz radiofrequency electromagnetic fields with cDNA microarray. *Toxicology*. 235(3):167-175.
- Zielinski RE (1998) Calmodulin and Calmodulin-Binding Protein in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49:697-725.

PUBLICATIONS ::

Roux D, Vian A, Girard S, Bonnet P, Paladian F, Davies E, Ledoigt G.

(2008) High frequency (900 MHz) low amplitude (5 V m^{-1}) electromagnetic field: a genuine environmental stimulus that affects transcription, translation, calcium and energy charge in tomato. ***Planta***. 227:883–891. (*document joint*)

-> Cet article a été sélectionné le 29/01/2008 pour « Faculty of 1000 Biology »
[<http://www.f1000biology.com/article/id/1099195/evaluation>]

Roux D, Faure C, Bonnet P, Girard S, Ledoigt G, Davies E, Gendraud M,

Paladian F, Vian A (2008) A possible role for extra-cellular ATP in plant responses to high frequency, low amplitude electromagnetic field. ***Plant Signaling and Behaviour***. 3(6):383-385. (*document joint*)

Roux D, Vian A, Girard S, Bonnet P, Paldian F, Davies E, Ledoigt G (2006)

Electromagnetic fields (900 MHz) evoke consistent molecular responses in tomato plants. ***Physiologia Plantarum***. 128(2):283-288. (*document joint*)

Vian A, Roux D, Girard S, Bonnet P, Paladian F, Davies E, Ledoigt G

(2006) Microwave irradiation affects gene expression in plants. ***Plant Signaling and Behaviour***. 1(2):67-69. (*document joint*)

Congrès :

Roux D, Vian A, Goupil P, Ledoigt G, Girard S, Paladian F, Bonnet P
(2005) MSRC measurements of high frequency non ionizing electromagnetic radiations (NIR) on living organisms. **16th International Zurich Symposium on Electromagnetic Compatibility** (13-18 Février 2005).

Abstract – The aim of this paper is to demonstrate responses in living organisms to electromagnetic radiation fields. This is achieved by a molecular approach which is based on (i) a very accurate method to measure the stressrelated transcripts (Real-Time Quantitative-PCR), (i) the rapidity of the method which allows avoiding all types of external contamination. (iii) plants as a biological model: they are immobile organism that can't escape the stimulation, and therefore are extremely sensitive to environmental stimulations. The stimulation (5V/m, 900MHz) is given to tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Solanaceae) using a Mode Stirred Reverberation Chamber. In plants grown under light/dark alternance, a rapid (5-15 min), transient and important (2-5 fold) increase in the accumulation of the LebZIP1 transcription factor transcripts is measured. In contrast, when plants are shielded, no modification in transcript accumulation is observed. Discussions about these results are provided and perspectives are suggested.

High frequency (900 MHz) low amplitude (5 V m^{-1}) electromagnetic field: a genuine environmental stimulus that affects transcription, translation, calcium and energy charge in tomato

David Roux · Alain Vian · Sébastien Girard ·
Pierre Bonnet · Françoise Paladian · Eric Davies ·
Gérard Ledoigt

Received: 24 July 2007 / Accepted: 29 October 2007 / Published online: 20 November 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Using an especially-designed facility, the Mode Stirred Reverberation Chamber, we exposed tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill. VFN8) to low level (900 MHz, 5 V m^{-1}) electromagnetic fields for a short period (10 min) and measured changes in abundance of three specific mRNA soon after exposure. Within minutes of electromagnetic stimulation, stress-related mRNA (calmodulin, calcium-dependent protein kinase and proteinase inhibitor) accumulated in a rapid, large and 3-phase manner typical of an environmental stress response. Accumulation of these transcripts into the polysomal RNA also took place (indicating that the encoded proteins were translated) but was delayed (indicating that newly-synthesized mRNA was not immediately recruited into polysomes). Transcript accumulation was maximal at normal Ca^{2+} levels and was depressed at higher Ca^{2+} , especially for those encoding calcium-binding proteins. Removal of Ca^{2+} (by addition of chelating agents or Ca^{2+} channel blocker) led to total suppression of mRNA accumulation. Finally, 30 min after the

electromagnetic treatment, ATP concentration and adenylate energy charge were transiently decreased, while transcript accumulation was totally prevented by application of the uncoupling reagent, CCCP. These responses occur very soon after exposure, strongly suggesting that they are the direct consequence of application of radio-frequency fields and their similarities to wound responses strongly suggests that this radiation is perceived by plants as an injurious stimulus.

Keywords Mode stirred reverberation chamber · Radiofrequency electromagnetic field · Stress · Tomato · Wound-like responses

Abbreviations

AEC	Adenylate energy charge
BAPTA	Bis aminophenoxy ethane tetraacetic acid
EGTA	Ethyleneglycol tetraacetic acid
EMF	Electromagnetic field
MSRC	Mode stirred reverberation chamber
RF	Radio frequency
RTqPCR	Real time quantitative PCR
CCCP	Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone

D. Roux · A. Vian (✉) · G. Ledoigt
EA 3296 ERTAC, Université Blaise Pascal,
Campus universitaire des Cézeaux,
63177 Aubiere Cedex, France
e-mail: Alain.VIAN@univ-bpclermont.fr

S. Girard · P. Bonnet · F. Paladian
UMR CNRS 6602 LASMEA, Université Blaise Pascal,
Campus universitaire des Cézeaux,
63177 Aubiere Cedex, France

E. Davies
Department of Plant Biology,
North Carolina State University,
Raleigh, NC 27695-7612, USA

Introduction

The increased use of wireless communication devices over the last two decades has raised concerns that radio frequency electromagnetic fields (RF-EMF) may interact with living organisms and has led to a plethora of studies on the topic. Unfortunately, many of these studies have employed electromagnetic devices with inappropriate or uncontrolled

emission parameters and a few demonstrate consistent effects of RF-EMF (Valberg et al. 2007). The majority of controversial RF-EMF studies have focused on complex responses such as human health or animal well-being. These depend on a multitude of different (and uncontrolled) factors and are concerned with long-term effects, thereby lessening the likelihood of a direct cause-effect relationship (Boice et al. 2002; Feychting et al. 2005). Plants are rarely used in RF-EMF experiments (Selga and Selga 1996; Tafforeau et al. 2002, 2004), partly because their very inertia makes the casual observer presume they are insensitive and thus unresponsive to their environment. In fact the opposite is more likely – their inability to escape the environment implies that plants must be able to sense subtle changes and adapt their responses accordingly (Vian et al. 1996; Ferguson 2004). Indeed, plants are able to sense various magnetic fields (Galland and Pazur 2005). Because they are non-motile, plants do not need to be constrained and because they are autotrophic, feeding/starvation does not impose an additional stress/variable. We have recently demonstrated that tomato plants react to RF-EMF and wounding in a similar manner and suggested that there may be a common mechanism behind these common responses (Roux et al. 2006; Vian et al. 2006; Beaubois et al. 2007). We have avoided the use of inappropriate or uncontrolled RF-EMF exposure by using the mode stirred reverberating chamber (MSRC; Roux et al. 2006; Vian et al. 2006): an especially constructed room, accepted as a standard for RF-EMF experiments, able to reproduce in a highly controlled and protected manner the characteristics of multi-directional RF-EMF urban radiation. Further, instead of measuring long-term, complex behavioural responses, we have chosen to measure rapid molecular responses (namely accumulation of stress-related transcripts and cellular energy state) that are more likely to be integral parts of the cause-effect relationship.

To accomplish this, tomato plants were exposed to short duration, low amplitude RF-EMF (900 MHz, 5 V m⁻¹, 10 min) and RTqPCR performed to assay the abundance of both total and polyribosome-associated transcripts, where assay of total mRNA measures net accumulation while assay of polysomal mRNA measures their current translation. Since all of the transcripts: *calm-n6* (Depège et al. 1997), *lecdpk1* (Chico et al. 2002) and *pin2* (Pearce et al. 1991) are wound-up-regulated, we were able to further probe the similarities between wounding and RF-EMF treatment and since two of them (*calm-n6*, *lecdpk1*) encode calcium-binding proteins, we examined the effects of varying calcium availability to determine if there was any feedback mechanism involved in their transcription. Finally, we also measured ATP concentration and adenylate energy charge (AEC) after RF-EMF exposure, as well as the effect of a potent uncoupling agent, CCCP, on transcript accumu-

lation, in order to assess the influence of RF-EMF on plant cell energy status and to correlate this with changes in mRNA abundances.

Materials and methods

Tomato plant culture

Seeds of *Lycopersicon esculentum* Mill. (cv VFN-8, obtained from INRA, Avignon, France and self-maintained in the laboratory greenhouse) were grown inside two identical custom-made (plywood) culture chambers with a hydroponic system and a light:dark photoperiod of 16:8 h, 26:21°C (175 μmol m⁻² s⁻¹ light intensity at the terminal leaf level provided by fluorescent tubes, Mazdafluor blanc industry Mazda-Philips, Paris, France) as previously described (Roux et al. 2006; Vian et al. 2006). Composition of the culture medium: macro-elements [85 μM NaCl; 0.55 mM MgSO₄ × 7 H₂O; 0.27 mM (NH₄)₂SO₄; 0.73 mM Ca(NO₃) × 4 H₂O; 1 mM KNO₃; 5.5 mM K₂HPO₄; 7.2 mM KH₂PO₄]; micro-elements [0.5 μM (MoO₄(NH₄)₂; 3.5 μM MnSO₄ H₂O; 4.9 μM ZnSO₄ H₂O; 9.1 μM H₃BO₃; 0.8 mM CuSO₄ H₂O]; 2‰ iron chelate. Each of the chambers allowed to grow 48 plants (i.e. 12 independent experiments of four samples: C, 15, 30, 60.) In order to obtain not-exposed samples (related data are displayed as “shielded”), one of the culture chambers was armoured with a multi-layered aluminium material to protect the plants from exposure to RF-EMF (without influencing the conditions of culture, Beaubois et al. 2007).

RF-EMF treatment

When the fourth terminal leaf appeared (i.e. 3 weeks old), plants were RF-EMF-stimulated by placing the whole culture chamber (24 h prior the RF-EMF treatment) in the MSRC. The MSRC is a large (200 m³) Faraday cage in which it is possible to emit, control and repeat the RF-EMF in a volume protected from external RF-EMF interferences (Roux et al. 2006; Vian et al. 2006; Beaubois et al. 2007). The aim of the MSRC is to create RF-EMF that illuminated plants from several directions with different polarizations (due to reflection properties of the MSRC). Plants are therefore placed in a volume where RF-EMF is homogeneous and isotropic (900 MHz; 5 V m⁻¹; 10 min). Control samples (C) were harvested immediately before starting the RF-EMF treatment and test samples (exposed and shielded) were harvested at different times after exposure (5, 15, 30, 60 min). The youngest terminal leaf of each plant was frozen in liquid nitrogen and constitutes a single sample (used either for RTqPCR or ATP measurement). Each result is expressed

as the mean of a minimum of three totally independent experiments \pm the standard error.

Polysome and RNA isolation

Total RNA and polysomal RNA were extracted from the youngest terminal leaf. Polysomes were isolated by homogenizing tissue in $2\times$ buffer U (400 mM Tris/HCl, pH 8.5; 400 mM saccharose; 60 mM $MgCl_2$; 120 mM KCl; 4 mM EGTA) containing 1% deoxycholate and 2.5% polyethylene-10-tridecylether, and pelleting the homogenate (with a TST-41.14 rotor, Kontron Ltd, Zurich, Switzerland) at 240.000g through a 1 ml pad of 50% saccharose in buffer B (40 mM Tris/HCl, pH 8.5; 20 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$) according to described protocols (Davies and Abe 1995). Total RNA and polysomal RNA were purified with Tri-reagent (Sigma, <http://www.sigmaaldrich.com>) according to the furnished protocol.

RTqPCR analysis

RTqPCR (iCycler iQ—BioRad; with qPCR Mastermix Plus for SYBR Green I, Eurogentec, <http://www.eurogentec.com>) were performed after cDNA synthesis (Reverse Transcriptase Core Kit, Eurogentec) using total or polysomal mRNA as template. The abundance of targeted transcripts was normalised to the housekeeping actin mRNA and set relative to the control plant (C, not exposed, harvested just before the RF-EMF treatment) according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen 2001). The accession numbers of targeted transcripts are: actin **BM956640**; calm-n6 **Y14764**; lecdpk1 **AF363784** and pin2 **AY129402**. To compensate plant-to-plant variability and to achieve statistical validity we performed triplicate real-time RTqPCR assays from at least three totally independent biological samples.

Calcium assay

Plants were transferred 24 h before the microwave stimulation onto fresh medium, either with regular calcium concentration (0.73 mM); calcium added (7.3 mM); calcium depleted (0 mM) or 0 mM calcium plus EGTA (0.5 mM), or BAPTA (0.4 mM) or $LaCl_3$ (0.1 mM).

Energy assay (ATP, AEC, CCCP)

ATP was extracted with perchloric acid (Keppler et al. 1970) and its concentration was measured with the ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Roche, <http://www.roche-applied-science.com>) associated with a microplate luminometer (LB96V Berthold, <http://www.berthold-ds.com>). Adenylate energy charge (Atkinson 1968) was

calculated after indirect enzymatic dosage of AMP and ADP (Pradet 1967) according to the following: $AEC = (ATP + \frac{1}{2} ADP)/(ATP + ADP + AMP)$. When used, 200 μ M of CCCP were added to a standard culture medium 90 min before RF-EMF experiment.

Statistical analysis

Statistical significance of the data was determined accordingly to the one-sided Mann–Whitney U test. Significant data (probability for the U value in the range 0.05–0.1) are indicated in the figure by an asterisk over the bars.

Results

Effects of RF-EMF on abundance of total and polysomal mRNA encoding stress-related genes

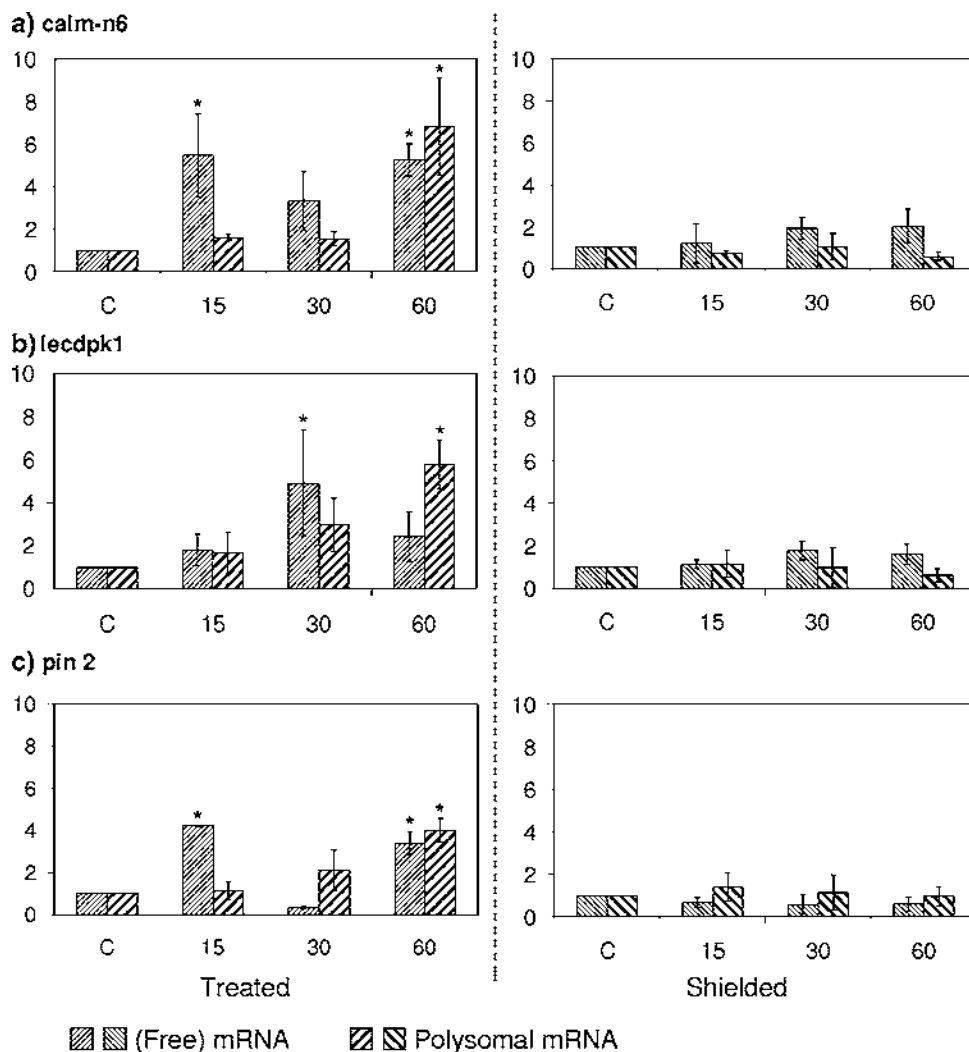
Figure 1 shows the relative accumulation of both total and polysomal mRNA of three stress-related markers: calmodulin-N6 (calm-n6; Fig. 1a), *Lycopersicon esculentum* calcium-dependent protein kinase (lecdpk1; Fig. 1b) and proteinase inhibitor II (pin2; Fig. 1c).

In the total RNA fraction (Fig. 1, treated), both calmodulin (Fig. 1a) and pin2 transcripts (Fig. 1c) exhibited the typical 3-phase stress response seen previously (Roux et al. 2006; Vian et al. 2006) with a maximum increase of 4.0- to 5.5-fold within 15 min, a decline at 30 min followed by a second increase at 60 min to 3.5- to 6.5-fold. The lecdpk transcript, however, exhibited a delayed 2-phase response, reaching a maximum of fivefold at 30 min before declining at 60 min (Fig. 1b). Changes in polysomal mRNA (Fig. 1, treated) were different from total RNA, but essentially identical to each other. In all cases, there was a slow increase, reaching a maximum of fourfold to sixfold the original level at 60 min. This indicates that there is a delay of at least 30 min between maximal accumulation of mRNA and its recruitment into polysomes. No significant change in total or polysomal mRNA accumulation was ever seen in shielded plants, i.e. plants treated in the aluminium armoured culture chamber (Fig. 1, shielded).

Requirement for optimal calcium for RF-EMF-evoked gene expression

Recent work from our laboratory (Beaubois et al. 2007) using a calcium channel blocker and a calcium chelating agent, has shown that calcium is needed for RF-EMF-evoked expression of pin2 and lezip1 mRNA. We wondered if this was true for other RF-EMF-induced stress genes and if so, how crucial was the calcium availability. Accordingly, we assayed the same three stress-related

Fig. 1 Relative changes in total mRNA and polysomal RNA abundance following the RF-EMF exposure. Plants were grown in the standard culture chamber (*treated*) and in the aluminium armoured culture chamber (*shielded*). Targeted transcripts (**a** *calm-n6*; **b** *lecdpk1*; **c** *pin2*) where bars represent mean values \pm SE from at least three independent experiments



transcripts used above (Fig. 1) under several conditions of calcium availability looking specifically at the early response—5 and 15 min after exposure. For all the following experiments, the shielded plants (grown in the armoured culture chamber) did not accumulate transcripts to levels significantly higher than the control (data not shown).

When plants were grown in culture medium containing regular amounts (0.73 mM) of calcium, the levels of *pin2* and *lecdpk1* transcripts remained essentially unchanged 5 min after termination of the treatment, while the *calm-n6* transcript increased more than threefold (Fig. 2a). However, 15 min after exposure, the level of *pin2* transcript had increased more than threefold, while both calcium related transcripts (*lecdpk1* and *calm-n6*) had increased fivefold (Fig. 2a). When plants were grown in liquid medium containing 7.3 mM calcium (ten times the normal concentration), accumulation of *pin2* (Fig. 2b, dark grey bar) was reduced compared with the regular calcium level (Fig. 2a, dark grey bar), but still showed a slight elevation (near two-

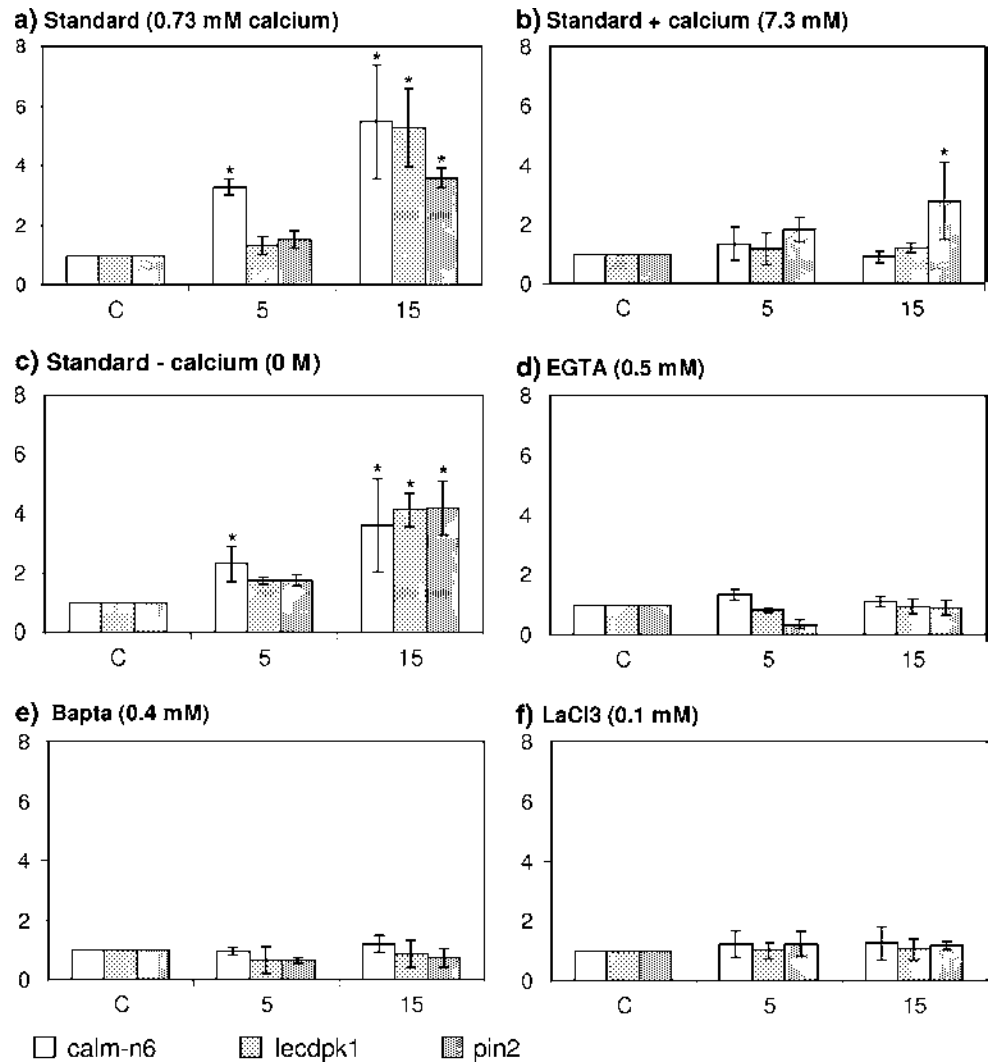
fold) at 5 min and a significant (almost threefold) increase at 15 min. However, accumulations of both the calcium-related transcripts (Fig. 2b, white and light grey bars) were totally suppressed.

When plants were grown with reduced amount of calcium, no significant decrease was found for any transcript (Fig. 2c). When calcium uptake was prevented either by adding the ion-chelating agent, EGTA (Fig. 2d), the very specific calcium-chelating agent, BAPTA (Fig. 2e) or the calcium channel blocker lanthanum chloride, LaCl_3 (Fig. 2f), no transcript accumulation occurred and in the case of *pin2* in EGTA 5 min after exposure, the level was severely reduced compared with the control (Fig. 2d).

Effects of RF-EMF on the energy status

Since both RNA synthesis (as estimated from accumulation of total RNA) and protein synthesis (whose potential is estimated from polysomal mRNA) are energy-consuming reactions, we decided to measure the ATP concentration and

Fig. 2 Effect of varying the availability of calcium on early transcript accumulation in response to the RF-EMF exposure. **a** Plants maintained on standard medium (0.73 mM of calcium); or **b** transferred to medium with tenfold extra calcium (7.3 mM). **c** Devoid of calcium (0 mM). **d** Devoid of calcium (0 mM) and containing 0.5 mM of EGTA (cation—Ca²⁺ preferred—chelating agent). **e** Devoid of calcium (0 mM) and containing 0.4 mM of BAPTA (a calcium chelating agent). **f** Devoid of calcium (0 mM) and containing 0.1 mM LaCl₃ (a calcium channel blocker). Bars represent mean values \pm SE of RF-EMF exposed samples from at least three independent experiments



AEC after RF-EMF exposure (Fig. 3). The ATP concentration was unchanged for the first 15 min after exposure, but then declined significantly by about 40% after 30 min and remained close to that level at 60 min (Fig. 3a). The AEC was also unchanged for the first 15 min and declined significantly to a ratio of 0.63 at 60 min (Fig. 3b). The AEC values for the shielded plants were all within the ratio of 0.8–0.9 which indicates that our culture conditions (within the enclosed culture chambers) were well suited to tomato plants.

The addition of the protonophore CCCP (200 μ M), a highly effective inhibitor of ATP synthesis (Heytler 1963), to the culture medium 90 min before RF-EMF exposure did not trigger by itself any stress response (Fig. 4). Indeed, in the presence of CCCP the plants protected from RF-EMF (in the armoured chamber) did not show any mRNA accumulation. However, this uncoupler led to a total inhibition of the transcript accumulation previously observed (Fig. 1) since plants exposed to RF-EMF displayed mRNA abundances indistinguishable from the shielded plants (Fig. 4).

Discussion

Tomato plants usually respond to wounding by accumulating stress-related transcripts in a typical 3-phase response: phase 1, initial period of rapid accumulation; phase 2, subsequent period of transcript decline; phase 3, second period of accumulation (Davies et al. 1997; Vian et al. 1999; Stankovic et al. 2000). During accumulation (phase 1, 3), transcription must exceed RNA degradation, while during phase 2 (transcript decline), RNA degradation must exceed RNA synthesis. This most likely results from enhanced RNase activity, which is known to be increased after injurious treatments (LeBrasseur et al. 2002). In the present work, although they are a downstream event in the signal transduction pathway, all three transcripts exhibited the typical 3-phase response with similar kinetics. Recruitment of mRNA into polysomes (translation) is not necessarily an immediate consequence of its synthesis (transcription; Davies and Larkins 1980). The data here exemplify this (Fig. 1). The period of maximum accumulation of the

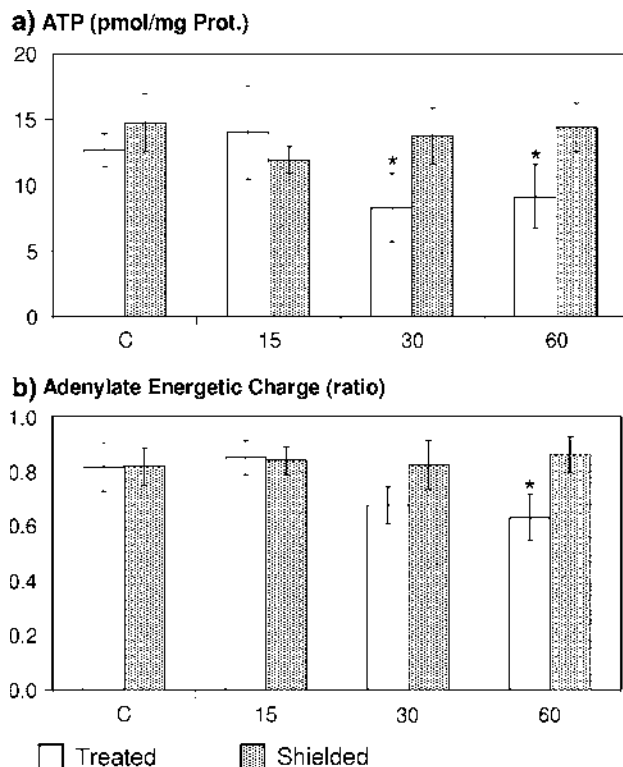


Fig. 3 Changes in ATP concentration and adenylate energy charge after RF-EMF exposure. Plants were grown in the standard culture chamber (*treated*) and in the aluminium armoured culture chamber (*shielded*). **a** ATP concentration (pmol/mg Prot.). **b** Adenylate energy charge (ratio). Bars represent mean values \pm SE from at least three independent experiments

stress-related transcripts in the total RNA fraction, which occurs by 15 or 30 min precedes that of accumulation into the polysomal RNA fraction (recruitment into polysomes) by at least 30 min. Similar enhancement of mRNA recruitment into polysomes has been described previously after a mild wound treatment (cotyledon pricking; Henry-Vian et al. 1995). These results do support the suggestion that the newly transcribed RNA is indeed translated and that the encoded proteins may well play a role in defence of the plant.

Here we focused on the effects of elevated calcium levels and on lowered available calcium using several different calcium-counteracting drugs applied individually to the culture medium of whole plants subjected to RF-EMF treatment (Fig. 2). When direct comparisons are made between responses to various calcium levels, clear patterns emerge. The transcripts encoding calcium-binding proteins (*calm-n6* and *lecdpk1*) are maximally accumulated only at regular calcium levels, whereas the non-calcium-related transcript, *pin2*, is essentially unaffected at greatly elevated or slightly reduced calcium levels. In high calcium condition (7.3 mM), calcium-related protein transcripts (calmodulin and CDPK) do not accumulate after RF-EMF exposure, yet

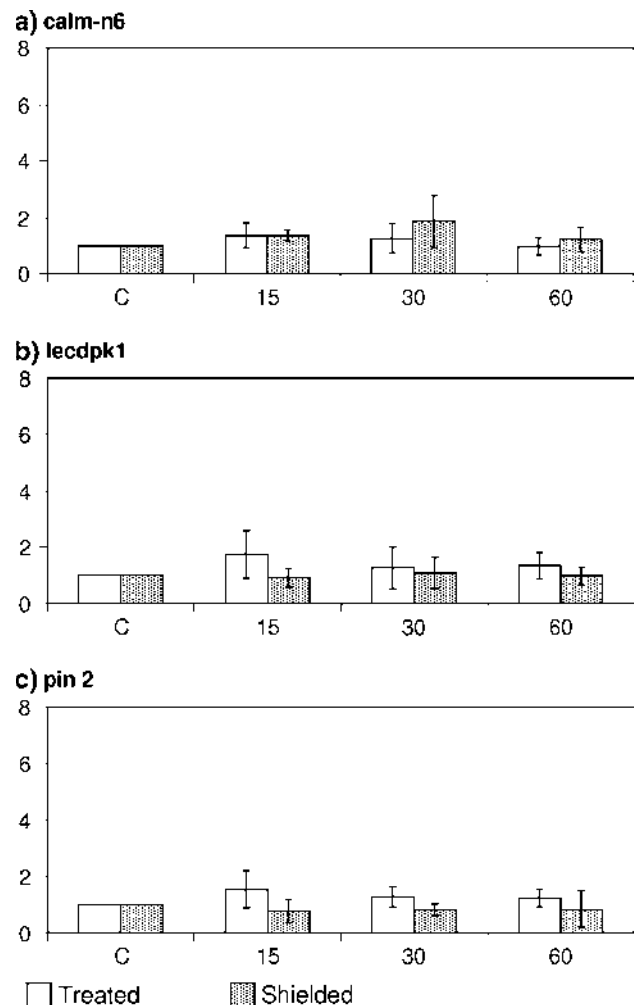


Fig. 4 Effect of the uncoupler CCCP (200 μ M) on transcript abundance in response to RF-EMF exposure. Plants were grown in the standard culture chamber (*treated*) and in the aluminium armoured culture chamber (*shielded*). Targeted transcripts (**a** *calm-n6*; **b** *lecdpk1*; **c** *pin2*) where bars represent mean values \pm SE from at least three independent experiments

Pin-2 transcripts do, suggesting that the latest is less affected by high calcium. When all calcium was removed from the medium and available calcium lowered even more by adding the chelating agent EGTA, a highly specific calcium-chelating agent BAPTA, or a calcium channel blocker LaCl_3 , there was no increase in any transcript. These drugs, which typically influence calcium-related genes expression (Leitner-Dagan and Weiss 1999), also inhibit transcript accumulation in response to wounding (Vian et al. 1997) and RF-EMF exposure (Beaubois et al. 2007). These observations support previous findings that calcium is essential for gene expression via its association with many transcription regulators and its requirement for RNA polymerase II activity (Coulon and Blanchard 2001). Moreover, these results also agree with the important but not exclusive role of external calcium in cell stress signalling and regulation

of cytoplasmic calcium concentration (Knight et al. 1997). Several hypotheses have been proffered concerning how RF-EMF could lead to Ca^{2+} modulation: by direct activation of the signal perception pathway (Trewavas 2000), by acting on the membrane-cytosol interface and/or by acting directly on the ion itself (Goodman and Blank 2002) or on ion channels (Aldinucci et al. 2003).

It is apparent that the energy state of the plants was affected by the RF-EMF treatment since it caused a decrease in ATP concentration and AEC (0.63) after 30 min (Fig. 3). AEC is a very sensitive parameter reflecting the energy state of cells. An organism maintained in suitable conditions usually displays AEC values in the range of 0.8–0.9. Any variation from this range is a consequence of modifying energy metabolism (Moal et al. 1991). The shielded plants here were all within these values (± 0.84), however the RF-EMF-exposed plants displayed at least 30% decrease. Similar transient energy variations have been observed after leaf-wounding experiments, especially a 30% decrease of AEC (Henry-Vian et al. 1996). It has been shown that ATP is one of the major mediators of stress transduction within the plant and that it is able to regulate the level of stress-related mRNA (Jeter et al. 2004). The decrease in ATP can be explained since it is immediately mobilised by many cellular process (especially RNA and protein synthesis) as soon as a stress event occurs (Dobrota 2006) and decreases in AEC occur after cell stress, especially anoxia (Blokhina et al. 2003). However, the adenylate nucleotide pool (ATP + ADP + AMP) remained at a steady-state level during our experiments (data not shown) suggesting that this energy decrease did not affect cell metabolism in a profound manner. It is highly likely the partial depletion of ATP results from its consumption during the energy-dependent processes of transcription and translation. By breaking the proton gradient with the use of the protonophore CCCP, with its subsequent lowering of ATP synthesis, the typical RF-EMF-evoked mRNA accumulation was completely suppressed (Fig. 4) implying a direct link between the energy potential of the cell and the genesis of the stress responses.

Injurious or non-injurious stimulations evoke an almost immediate modification of membrane potential that is transmitted through the plant as an action potential or a variation potential, depending upon the strength of the stimulus. These electrical signals have been formally linked to the accumulation of the stress-related transcript, Pin (Weldon et al. 1992; Stankovic and Davies 1997; Herde et al. 1999), calmodulin (Vian et al. 1996) and CMBP (Vian and Davies 2006). Calcium counteracting drugs reduced the amplitude of these electrical signals (Julien et al. 1991) and suppressed the accumulation of calmodulin transcripts after wounding (Vian et al. 1997). It has also been shown that CCCP causes a strong membrane depolarization (Lew and

Spanswick 1984). When plants are exposed only locally (i.e. on the oldest leaf), the rest of the plant (protected from RF-EMF inside the armoured culture chamber) also shows almost identical stress-related transcript accumulation, suggesting the very rapid transmission of an informative signal (Beaubois et al. 2007). The genesis and/or transmission of this signal is exceedingly rapid and strongly dependent upon calcium. These characteristics suggest that an electrical wave of depolarisation is produced after exposing plants to RF-EMF (Beaubois et al. 2007). Taken together, these results imply the involvement of membrane potential in both the local and distant responses of tomato to RF-EMF exposure. This is consistent with many reports, which propose that the plasma membrane is the primary site of interaction between living organisms and RF-EMF (Galvanovskis and Sandblom 1997; Astumian 2003). This could also imply that energy is needed to generate the systemic electrical signal thought to be the mediator of the whole plant responses to wounding (Davies and Stankovic 2006) and RF-EMF exposure (Beaubois et al. 2007), again supporting the injury-like effect (Tafforeau et al. 2004; Roux et al. 2006; Vian et al. 2006) of microwaves on plants.

Taken as a whole, the data provide new evidence supporting the hypothesis that plants perceive and respond to microwave irradiation as though it was an injurious treatment. Even though the RF-EMF is non-thermal and the total power we used very low (0.1 W dissipated in 200 m³), the similarities with wounding (leaf-pricking, burning and cutting) are striking. In addition to the rapidity of the response and its dependency on the second messenger calcium, we observed a strong correlation between all the parameters measured (total and polysomal transcript abundance, ATP concentration and AEC). This suggests a functional relationship between them all. Further work will help in understanding the transduction pathways involved and how the RF-field interacts with the cell.

Acknowledgments The authors wish to thank the French Ministry of Education and Research for the grant awarded to G. Ledoigt from ACI RTM 0005 “Effets biologiques et sanitaires de la téléphonie mobile” and Pr Gendraud (Université Blaise Pascal) for advices on ATP metabolism.

References

- Aldinucci C, Garcia JB, Palmi M, Sgaragli G, Benocci A, Meini A, Pessina F, Rossi C, Bonechi C, Pessina GP (2003) The effect of exposure to high flux density static and pulsed magnetic fields on lymphocyte function. *Bioelectromagnetics* 24:373–379
- Astumian R (2003) Adiabatic pumping mechanism for ion motive ATPases. *Phys Rev Lett* 91(118192):1–4
- Atkinson DE (1968) The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7:4030–4034

- Beaubois É, Girard S, Lallechere S, Davies E, Paladian F, Bonnet P, Ledoigt G, Vian A (2007) Intercellular communication in plants: evidence for two rapidly systemic signals generated in response to electromagnetic field stimulation in tomato. *Plant Cell Environ* 30:834–844
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 91:179–194
- Boice JD, McLaughlin JR, McLaughlin JK (2002) Epidemiologic studies of cellular telephones and cancer risk. Supplemental Security Income (SSI) Report 6–38
- Chico JM, Raíces M, Téllez-Iñón MT, Ulloa RM (2002) A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant Physiol* 128:256–270
- Coulon C, Blanchard JM (2001) Flux calciques et expression génique. *Med Sci* 17:969–978
- Davies E, Larkins BA (1980) Ribosomes. In: Stumpf PK, Conn EE (eds) *Plant biochemistry: a comprehensive treatise*, vol I. Academic, New York, pp 413–435
- Davies E, Abe S (1995) Methods for isolation and analysis of polyribosomes. *Methods Cell Biol* 50:209–222
- Davies E, Stankovic B (2006) Electrical signals, the cytoskeleton and gene expression: current hypotheses. In: Baluska F, Mancuso S, Volkmann D (eds) *Communication in plants—neuronal aspects of plant life*. Springer, Berlin, pp 309–320
- Davies E, Vian A, Henry-Vian C, Stankovic B (1997) Rapid systemic up-regulation of genes after heat-wounding and electrical stimulation. *Acta Phys Plant* 19:571–576
- Depège N, Thonat C, Coutand C, Julien JL, Boyer N (1997) Morphological responses and molecular modifications in tomato plants after mechanical stimulation. *Plant Cell Physiol* 38:1127–1134
- Dobrota C (2006) Energy dependant plant stress acclimation. *Rev Environ Sci Bio/Tech* 5:243–251
- Ferguson IB (2004) The plant response: stress in the daily environment. *J Zhejiang Univ Sci* 5:129–132
- Feychting M, Ahlbom A, Kheifets L (2005) EMF and health. *Annu Rev Public Health* 26:65–89
- Galland P, Pazur A (2005) Magnetoreception in plants. *J Plant Res* 118:371–389
- Galvanovskis J, Sandblom J (1997) Amplification of electromagnetic signals by ion channels. *Biophys J* 73:3056–3065
- Goodman R, Blank M (2002) Insights into electromagnetic interaction mechanisms. *J Cell Physiol* 192:16–22
- Henry-Vian C, Vian A, Dietrich A, Ledoigt G, Desbiez MO (1995) Changes in the polysomal mRNA population upon wound signal expression or storage in *Bidens pilosa*. *Plant Physiol Biochem* 33:337–344
- Henry-Vian C, Vian A, Ledoigt G, Desbiez MO (1996) Effect of wounding on nucleotide pools in *Bidens pilosa* L. *Biol Plant* 38:191–196
- Herde O, Peña-Cortés H, Wasternack C, Willmitzer L, Fisahn J (1999) Electric signaling and *Pin2* gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiol* 119:213–218
- Heytler PG (1963) Uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanide phenylhydrazones. I. Some characteristics of m-Cl-CCP action on mitochondria and chloroplasts. *Biochemistry* 2:357–361
- Jeter CR, Tang W, Henaff E, Butterfield T, Roux SJ (2004) Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2652–2664
- Julien JL, Desbiez MO, De Jaegher G, Frachisse JM (1991) Characteristics of the wave of depolarization induced by wounding in *Bidens pilosa*. *J Exp Bot* 42:131–137
- Keppler D, Rudigier J, Decker K (1970) Enzymic determination of uracil nucleotides in tissues. *Anal Biochem* 38:105–114
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1997) Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 12:1067–1078
- LeBrasseur ND, MacIntosh GC, Pérez-Amador MA, Saitoh M, Green PM (2002) Local and systemic wound-induction of RNase and nuclease activities in *Arabidopsis*: RNS1 as a marker for a JA-independent systemic signaling pathway. *Plant J* 29:393–403
- Leitner-Dagan Y, Weiss D (1999) Ca^{2+} , calmodulin and protein dephosphorylation are required for GA-induced gene expression in *Petunia corolla*. *Physiol Plant* 105:116–121
- Lew R, Spanswick RM (1984) Characterization of the electrogenicity of soybean (*Glycine max* L.) roots ATP dependence and effect of ATPase inhibitors. *Plant Physiol* 75:1–6
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408
- Moal J, Le Coz JR, Samain JF, Daniel JY, Bodo A (1991) Oyster adenylate energy charge: response to levels of food. *Aquat Living Resour* 4:133–138
- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253:895–898
- Pradet A (1967) Etude des adenosines-5' mono, di et tri-phosphates dans les tissus végétaux. I-dosage enzymatique. *Physiol Vég* 5:209–221
- Roux D, Vian A, Girard S, Bonnet P, Paladian F, Davies E, Ledoigt G (2006) Electromagnetic fields (900 MHz) evoke consistent molecular responses in tomato plants. *Physiol Plant* 128:283–288
- Selga T, Selga M (1996) Response of *Pinus sylvestris* L. needles to electromagnetic fields. *Sci Total Environ* 180:65–73
- Stankovic B, Davies E (1997) Intercellular communication in plants: electrical stimulation of proteinase inhibitor gene expression in tomato. *Planta* 202:402–406
- Stankovic B, Vian A, Henry-Vian C, Davies E (2000) Molecular cloning and characterization of a tomato cDNA encoding a systemically wound-inducible bZIP DNA-binding protein. *Planta* 212:60–66
- Tafforeau M, Verdu MC, Norris V, White GJ, Demarty M, Thellier M, Ripoll C (2002) SIMS study of the calcium-deprivation step related to epidermal meristem production induced in flax by cold shock or radiation from a GSM telephone. *J Trace Microprobe Techn* 20:611–623
- Tafforeau M, Verdu MC, Norris V, White GJ, Cole M, Demarty M, Thellier M, Ripoll C. (2004) Plant sensitivity to low intensity 105 GHz electromagnetic radiation. *Bioelectromagnetics* 25:403–407
- Trewavas AJ (2000) Signal perception and transduction. In: Buchanan R, Jones R, Gruissem W (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Texas, pp 930–987
- Valberg PA, van Deventer TE, Repacholi MH (2007) Base stations and wireless networks: Radiofrequency (RF) exposures and health consequences. *Environ Health Perspect* 115:416–424
- Vian A, Davies E (2006) Two different wound signals evoke very rapid, systemic CMBP transcript accumulation in tomato. *Plant Sign Behav* 1:261–264
- Vian A, Henry-Vian C, Schantz R, Ledoigt G, Frachisse JM, Desbiez MO, Julien JL (1996) Is membrane potential involved in calmodulin gene expression after external stimulation in plants? *FEBS Lett* 380:93–96
- Vian A, Henry-Vian C, Schantz R, Schantz ML, Davies E, Ledoigt G, Desbiez MO (1997) Effect of calcium and calcium-counteracting drugs on the response of *Bidens pilosa* L. to wounding. *Plant Cell Physiol* 38:751–753

- Vian A, Henry-Vian C, Davies E (1999) Rapid and systemic accumulation of chloroplast mRNA-binding protein transcripts after flame stimulus in tomato. *Plant Physiol* 121:517–524
- Vian A, Roux D, Girard S, Bonnet P, Paladian F, Davies E, Ledoigt G (2006) Microwave irradiation affects gene expression in plants. *Plant Sign Behav* 1:67–70
- Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb IR, Reilly AJ, Skipper YD, Doherty HM, O'Donnell PJ, Bowles DJ (1992) Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360:62–65

Article Addendum

A possible role for extra-cellular ATP in plant responses to high frequency, low amplitude electromagnetic field

David Roux,¹ Catherine Faure,¹ Pierre Bonnet,² Sébastien Girard,² Gérard Ledoigt,¹ Eric Davies,³ Michel Gendraud,⁴ Françoise Paladian² and Alain Vian^{1,*}

¹EA 3296 ERTAC; ²UMR CNRS 6602 LASMEA; Université Blaise Pascal; Aubrière, France; ³North Carolina State University; Department of Plant Biology; Raleigh, North Carolina USA; ⁴Université Blaise Pascal; Aubrière, France

Abbreviations: AEC, adenylate energy charge; CCCP, carbonyl cyanine 3-chlorophenylhydrazone; eATP, extra-cellular ATP; EMF, electromagnetic field

Key words: EMF, ATP, eATP, tomato, stress

In parallel to evoking the accumulation of stress-related transcripts, exposure to low level 900 MHz EMF affected the levels of ATP, the main energy molecule of the cell. Its concentration dropped rapidly (27% after 30 min) in response to EMF exposure, along with a 18% decrease in the adenylate energy charge (AEC), a good marker of cell energy status. One could interpret this decrease in ATP and AEC in a classical way, i.e., as the result of an increase in cellular energy usage, but recent work brings exciting new insights in pointing out a signalling function for ATP, especially in the stress physiology context where it could trigger both reactive oxygen species and calcium movement (this latter being involved in plant responses to EMF exposure). In this addendum, we discuss our results within this new perspective for ATP function.

The use of wireless devices has caused a massive increase in high frequency EMF (900–2400 MHz) in the environment that has long been suspected for its possible impact on living organisms.¹ Plants have proven to be very useful model systems that undergo physiological modification after exposure to various kinds of EMF.^{2,3} Recent publications from our group have pointed out that plants exposed for as little as 10 min to a low-level, high frequency isotropic and homogeneous electromagnetic field (5 V.m⁻¹, 900 MHz produced in a Mode Stirred Reverberation Chamber) displayed a rapid and major increase (3–7 fold) in accumulation of stress-related transcripts (bZIP, calmodulin, Pin2, CDPK, etc.).^{4,5} The pattern, the amplitudes and the kinetics of these responses were quite similar to those evoked by tissue flaming or crushing.^{6,7} These responses occurred

systemically (in distant, non-exposed tissue) after local exposure, and were highly dependent on both abscisic and jasmonic acids metabolisms.⁸ Furthermore, treatment of plants with calcium counteracting drugs (EGTA, BAPTA and LaCl₃) abolished the normal responses of plants to EMF exposure.⁹ Taken together, these results strongly suggest that low level, high frequency EMF actually acts as an environmental stimulus able to evoke, in plants, molecular changes that are similar to those induced by injurious treatments.

Of particular importance here and what makes plants fundamentally different from, and more sensitive to EMF than, animals is their high surface to volume ratio. Plants have a high proportion of their above-ground (leaf) cells at the surface, with a direct interface to EMF,¹⁰ and which produce abundant amounts of ATP.

Indeed, most pertinent to this discussion arise from EMF-induced changes in the status of ATP, the major energy-related molecule of the cell that is directly or indirectly involved in most physiological process. In our culture conditions, the terminal leaf of un-stimulated tomato plants contained normal ATP concentration (12–15 pmol.mg⁻¹ protein). However, exposure of the plant to EMF caused a large drop (30%) within 30 minutes, leading to an average ATP content of 8–9 pmol.mg⁻¹ protein (Fig. 1, left). In parallel, the adenylate energy charge (AEC) also decreased 23% from 0.82 to near 0.63 (60 min), with the latter value being extremely low for an actively growing tissue (Fig. 1, left).

Plant treatment with the uncoupling agent CCCP, that dissipates proton gradients across membranes (thus perturbing the biosynthesis of ATP), totally inhibited the molecular responses that normally occur after irradiation.⁹ Thus, it is highly likely that ATP is a critical parameter for processing the plant response to EMF exposure. In this context, it is worth noting that transcript recruitment into polysomes occurred later in the response cascade than changes in ATP, strongly implying that ATP is indeed involved in earlier events.

Similar decreases (about 30%) in ATP content have been noted after different kinds of environmental stimulus in various organisms such as slime-molds¹¹ or mammals¹² after EMF exposure, or in plants after wounding.¹³ These decreases were interpreted as an EMF-induced reduction in ATP synthesis and/or an increase in cell energy needs (resulting in more ATP consumption). However, new

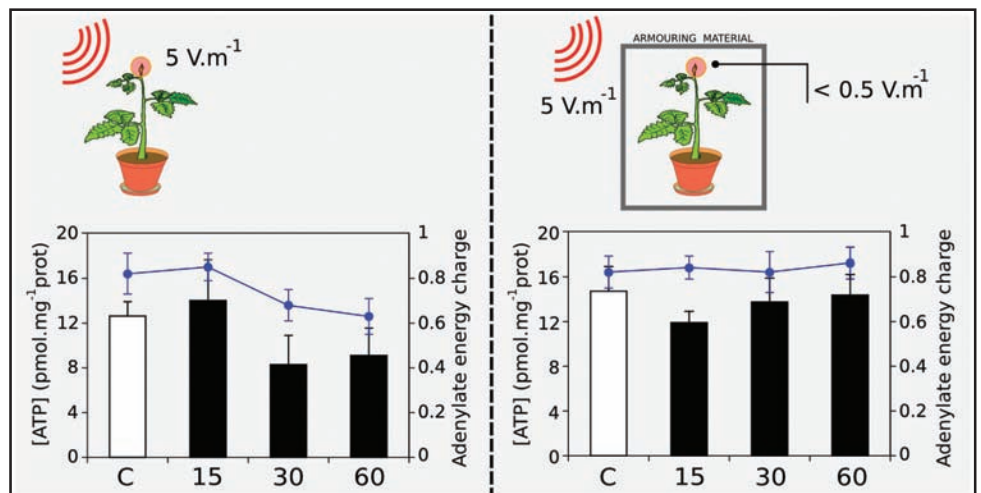
*Correspondence to: Alain Vian; UMR CNRS 6602 LASMEA; Université Blaise Pascal; Campus Universitaire des Cézeaux, 63177; Aubière cedex, France; Tel.: 33.473.407.918; Fax: 33.473.407.340; Email: Alain.VIAN@univ-bpclermont.fr

Submitted: 12/03/07; Accepted: 12/07/07

Previously published online as a *Plant Signaling & Behavior* E-publication: <http://www.landesbioscience.com/journals/psb/article/5385>

Addendum to: Roux D, Vian A, Girard S, Bonnet P, Paladian F, Davies E, Ledoigt G. High frequency (900 MHz) low amplitude (5 V m⁻¹) electromagnetic field: a genuine environmental stimulus that affects transcription, translation, calcium and energy charge in tomato. *Planta* 2008; 227:883–91.

Figure 1. Changes in ATP (boxes) and Adenylate Energy Charge (AEC, lines) after low intensity (10 min, 5 V m^{-1}) high frequency (900 MHz) EMF exposure in a Mode Stirred Reverberation Chamber. Plants were directly exposed to the EMF radiation (left) or protected in an EMF-proof, armoured culture chamber (right), where the EMF amplitude was lower than 0.5 V m^{-1} . The terminal leaf (red circle) was harvested before EMF application (C, white boxes) or 15, 30 and 60 min after the end of the 10 min EMF exposure (15, 30, 60, black boxes) and assayed for energy-related compounds.⁹



functions assigned to ATP have brought new insight. In several recent publications, this energy-related nucleoside has been proposed to play an important role as an informative molecule outside the plant cell (i.e., extra-cellular ATP),^{14,15} leading to the “eATP” concept that has been long known in animal physiology.^{16,17} This eATP was proposed to act as a major signalling molecule implicated in many aspects of local and systemic stress signaling including calcium movement and induction of reactive oxygen species.^{18,19} The intrinsic polar characteristics of ATP make the plasmalemma highly impermeable to this molecule, and strongly question the mechanism of its externalization. Proposed explanations include leakage out of damaged cells at the wound sites and exocytosis.¹⁹ This latter explanation is of great interest in the context of EMF, since exo- and/or endo-cytosis appear to be affected by exposure to electromagnetic radiation.²⁰ External ATP has been reported to play a role in membrane potential,²¹ which may be involved in long distance signalling after a local EMF stimulus in tomato.⁸ Thus, it is very tempting to propose an EMF-induced release of ATP from cells and this may account for at least part of the rapid reduction in ATP induced by EMF exposure, since the eATP can be rapidly degraded by ecto-apyrases.^{19,22} Extracellular ATP (1–3 mM) has also been implicated in another instance of environmental perception/response, in this case gravity.²³ We propose eATP as a potential player in the plant response to EMF exposure (Fig. 2).

Taken together, these data raise the question of whether ATP is released after EMF exposure. Its demonstration would bring exciting new ideas to better understand interactions of living organisms with low amplitude EMF, which is of increasing importance nowadays because of the vast increase in usage of wireless communication devices.

References

- Lacy Hulbert A, Metcalfe J, Hesketh R. Biological responses to electromagnetic fields. *FASEB J* 1998; 12:395-420.
- Tafforeau M, Verduis MC, Norris V, White G, Demarty M, Thellier M, Ripoll C. SIMS study of the calcium-deprivation step related to epidermal meristem production induced in flax by cold shock or radiation from a GSM telephone. *J Trace Microprobe Techn* 2002; 20:611-23.
- Tafforeau M, Verduis MC, Norris V, White GJ, Cole M, Demarty M, Thellier M, Ripoll C. Plant sensitivity to low intensity 105 GHz electromagnetic radiation. *Bioelectromagnetics* 2004; 25:403-7.
- Vian A, Roux D, Girard S, Bonnet P, Paladian F, Davies E, Ledoigt G. Microwave irradiation affects gene expression in plants. *Plant Sign Behav* 2006; 1:67-70.
- Roux D, Vian A, Girard S, Bonnet P, Paladian F, Davies E, Ledoigt G. Electromagnetic fields (900 MHz) evoke consistent molecular responses in tomato plants. *Physiol Plant* 2006; 128:283-8.

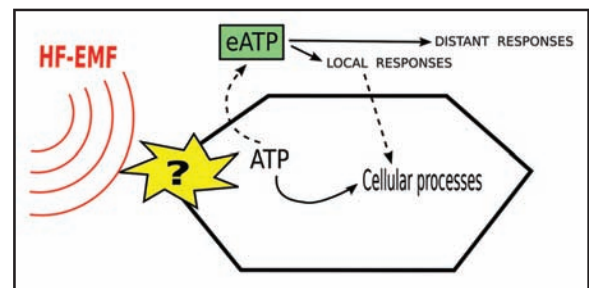


Figure 2. A general scheme proposing a role for external ATP (eATP) in the response pathways to low level, high frequency EMF exposure. The mechanism for the externalization of the polar ATP molecule has been recently extensively discussed.¹⁹

- Vian A, Henry Vian C, Davies E. Rapid and systemic accumulation of chloroplast mRNA binding protein transcripts after flame stimulus in tomato. *Plant Physiol* 1999; 121:517-24.
- Stankovic B, Vian A, Henry Vian C, Davies E. Molecular cloning and characterization of a tomato cDNA encoding a systematically wound-inducible bZIP DNA-binding protein. *Planta* 2000; 212:60-6.
- Beaubois É, Girard S, Lallechère S, Davies E, Paladian F, Bonnet P, Ledoigt G, Vian A. Intercellular communication in plants: evidence for two rapidly-transmitted systemic signals generated in response to EMF stimulation in tomato. *Plant Cell and Environ* 2007; 30:834-44.
- Roux D, Vian A, Girard S, Bonnet P, Paladian F, Davies E, Ledoigt G. High frequency (900 MHz) low amplitude (5 V m^{-1}) electromagnetic: a genuine environmental stimulus that affects transcription, translation, calcium and energy charge in tomato. *Planta* 2008; 227:883-91.
- Vian A, Faure C, Girard S, Davies E, Hallé F, Bonnet P, Ledoigt G, Paladian F. Plants do respond to GSM-like radiations. *Plant Sign Behav* 2007; 2:522-24.
- Marron M, Goldman E, Greenebaum B, Tipnis P. Effects of sinusoidal 60 Hz electric and magnetic fields on ATP and oxygen levels in the slime mold, *Physarum polycephalum*. *Bioelectromagnetics* 1986; 7:307-14.
- Sanders A, Joines W, Allis J. Effect of continuous wave, pulsed, and sinusoidal-amplitude modulated microwaves on brain energy metabolism. *Bioelectromagnetics* 1985; 6:89-97.
- Henry Vian C, Vian A, Dietrich A, Ledoigt G, Desbiez MO. Effect of wounding on nucleotide pools in *Bidens pilosa* L. *Biol Plant* 1996; 38:191-6.
- Demidchik V, Nichols C, Oliynyk M, Dark A, Glover BJ, Davies JM. Is ATP a signaling agent in plants? *Plant Physiol* 2003; 133:456-61.
- Kim SY, Sigaguru M, Stacey G. Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiol* 2006; 142:984-92.
- Novak I. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci* 2003; 18:12-7.
- Hanley PJ, Musset B, Renigunta V, Limberg SH, Dalpke AH, Sus R, Heeg KM, Preisig Müller RP, Daut J. Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca^{2+} and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 101:9479-84.

18. Song CJ, Steinebrunner I, Wang X, Stout SC, Roux SJ. Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2006; 140:1222-32.
19. Roux S, Steinebrunner I. Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants. *Trends in Plant Sci* 2007; 12:522-27.
20. Mahroua N, Polgea Morarub R, Moisesca MG, Orłowski S, Levêque P, Mira LM. In vitro increase of the fluid-phase endocytosis induced by pulsed radiofrequency electromagnetic fields: importance of the electric field component. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1668:126-37.
21. Lew RR, Dearnaley JDW. Extracellular nucleotide effects on the electrical properties of growing *Arabidopsis thaliana* root hairs. *Plant Sci* 2000; 153:1-6.
22. Jeter CR, Tang W, Henaff E, Butterfield T, Roux SJ. Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004; 16:2652-64.
23. Tang W, Brady SR, Sun Y, Muday GK, Roux SJ. Extracellular ATP inhibits root gravitropism at concentrations that inhibit polar auxin transport. *Plant Physiol* 2003; 131:147-54.

Electromagnetic fields (900 MHz) evoke consistent molecular responses in tomato plants

David Roux^a, Alain Vian^{a,*}, Sébastien Girard^b, Pierre Bonnet^b, Françoise Paladian^b, Eric Davies^c and Gérard Ledoigt^a

^aERTAC (EA 3296), Department of Biology

^bLASMEA (UMR CNRS 6602), Department of Physics Université Blaise Pascal 24 avenue des Landais 63177 AUBIERE CEDEX France

^cDepartment of Botany, North Carolina State University, Box 7612, RALEIGH NC 27695-7612 USA

Correspondence

*Corresponding author,

e-mail: Alain.VIAN@ertac.univ-bpclermont.fr

Received 14 December 2005;

revised 21 March 2006

doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00740.x

Although the effects of high-frequency electromagnetic fields on biological systems have been studied frequently, unequivocal results have rarely been obtained, primarily because suitably controlled experiments could not be performed. In the present work, tomato plants were exposed to a homogeneous and isotropic field (900 MHz) using a mode stirred reverberation chamber, and the stress-related transcripts (calmodulin, protease inhibitor and chloroplast mRNA-binding protein) were assayed by real-time quantitative PCR. Exposure to an electromagnetic field induced a biphasic response, in which the levels of all three transcripts increased four- to six-fold 15 min after the end of electromagnetic stimulation, dropped to close to initial levels by 30 min, and then increased again at 60 min. We deliberately focused on the very early molecular responses to high-frequency electromagnetic fields in order to minimize secondary effects.

Introduction

The development and increased use of wireless communication technologies in recent years have aroused suspicion that there may be hazardous effects of High-Frequency (HF) Electromagnetic Fields (HF-EMFs) on living systems, including humans (Elwood 2003). A wide range of EM signals emitted by the global system for mobile phone (GSM) networks are mixed in urban areas locally displaying an HF-EM environment with ampli-

tudes of several volts per meter. Frequently, mobile phones or mobile phone-like devices are used for electromagnetic exposure experiments (Dasdag et al. 2003, Haarala et al. 2003, Irmak et al. 2002, Weisbrot et al. 2003), as are other emitting devices, such as transversal electromagnetic cells (Marinelli et al. 2004), parallel plate resonators (Mashevich et al. 2003), wave guides (Czyz et al. 2004) and anechoic chambers (Gos et al. 2000). We utilized a Mode Stirred Reverberation Chamber (MSRC), since it has recently been recognized in the IEC 61000-4-21 standard (IEC 2003) as a stimulation device. The main advantages of the MSRC are that it provides protection from environmental EMF and creates a statistically isotropic and homogeneous EMF similar to that found in urban environments (Otterskog and Madsén 2003), ensuring that experiments are directly related to the sole variable, that of EMF exposure.

The majority of EMF studies, especially in epidemiology, have led to highly conflicting conclusions (Elwood 2003; Levin 2003). For example, human behaviors such as cognitive performance (Haarala et al. 2003) and comportment (D'Andrea et al. 2003) did not yield conclusive results, because of the difficulty in evaluating psychology-related parameters. Similar kinds of problem have been encountered with animals (mainly rabbit and rat by Irmak et al. 2002 and Dasdag et al. 2003), due to the stress generated by the experimental protocol. Data obtained from culture of immunity-related cells (Aldinucci et al. 2003; Marinelli et al. 2004; Mashevich

Abbreviations – AP, Action Potential; EMF, Electromagnetic Field; GSM, Global System for Mobile phone; HF, High Frequency; MSRC, Mode Stirred Reverberation Chamber; RT-qPCR, Real-Time quantitative PCR; SEM, Standard Error of the Mean; VP, Variation Potential.

et al. 2003) are the most convincing: they show effects of HF-EMF at the cellular or molecular level (such as decrease in DNA stability, Ca^{2+} movement, deregulation of apoptosis). However, an intact organism is preferable to cultured cells, since the former maintains its full potential for signal perception, transduction and response. With this in mind, we focused our attention on the tomato plant (*Lycopersicon esculentum*), the model system for studying plant responses to environmental stresses such as wounding, in order to circumvent any psychological factors and to allow control of all potential environmental variables (i.e. light, temperature, nutrients, handling) that may modulate perception of, or response to, the EMF stimulus. Plants, notably flax, have already given noteworthy results in response to HF-EMF (Tafforeau et al. 2002, 2004, 2006).

Many studies focused on animal behavior and cancer have furnished contradictory results because of the difficulty in identifying relevant parameters that are measurable in a rapid and repeatable manner. This contrasts with experiments associated with clearly defined parameters such as oxidative stress (Irmak et al. 2002), gene expression (Czyz et al. 2004), Ca^{2+} movement (Aldinucci et al. 2003), genomic stability (Marinelli et al. 2004), or heat shock proteins (Weisbrot et al. 2003), which generate reproducible data. However, many of these studies measured responses after hours (Marinelli et al. 2004), days (Mashevich et al. 2003) or even months (Dasdag et al. 2003) following the electromagnetic stimulus. In striking contrast, we were interested in the very rapid molecular responses following electromagnetic stimulation, in order to minimize side effects and the possible influence of other factors. To do this, we measured changes in the abundance of three previously identified wound-induced transcripts that are known to play a role in the early events of plant responses to stress. Here we show that a non-thermal HF-EMF (900 MHz, 5 V m^{-1}) is able to evoke rapid accumulation of these transcripts. Future work will be directed towards the global analysis of microwave-induced gene expression (microarrays) and comparison with other stresses.

Materials and methods

Plant culture

Tomato plants (*Lycopersicon esculentum* cv. VFN-8) were grown inside a plywood custom-made culture chamber for 3 weeks (until the fourth terminal leaf appears). A controlled hydroponic system was used for culture with a light/dark photoperiod of 16 : 8 h, 26 : 21°C ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ light intensity, Mazdafluor blanc industrie, Mazda-Philips, Paris, France).

Electromagnetic stimulation

The MSRC is a system with several essential components constructed especially to give reproducible EMF stimulation (Fig. 1). It consists of: a large room with a double-layered steel wall, acting as a Faraday cage and protecting experiments from environmental electromagnetic pollution; an antenna to generate the EMF; movable blades to stir the EMF so that it is statistically homogeneous and isotropic in a determined working volume; and a control panel to generate the appropriate EMF with the following characteristics: frequency, 900 MHz non-modulated; amplitude, 5 V m^{-1} (average signal amplitude of a GSM telephone) and 40 V m^{-1} (close to the French legal emission limit); duration, 2–10 min (within the duration of a GSM phone call). The culture chambers containing plants were placed in the working volume of the MSRC 24 h prior to EMF exposure, to avoid possible stress responses due to the moving procedure. The wooden culture chamber had no major influence on the EMF characteristics (homogeneity and isotropy) received. In control (i.e. 'shielding') experiments, plants were placed in the culture chamber enclosed in a polymer mesh covered with aluminum foil to prevent exposure to EMF (Vian et al., 2006). In all cases, the fourth leaf of control and treated plants was harvested at the appropriate time and immediately frozen in liquid nitrogen. A single plant was used for each point of the kinetic, and the experiments were independently repeated at least three times. The plants were discarded after tissue collection.

1. Mode Stirred Reverberation Chamber
2. Emission antenna
3. Mode stirrer
4. Plant culture chamber, in the working area
5. Control equipment

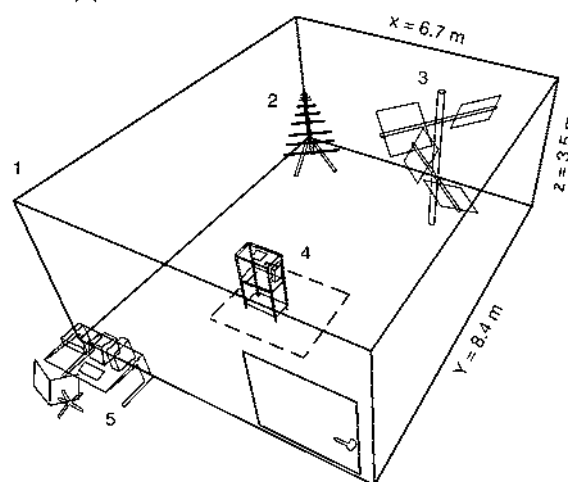


Fig. 1. The MSRC equipment especially designed to generate homogeneous and isotropic HF-EMF.

mRNA extraction and cDNA synthesis

mRNA extraction was performed using Tri-reagent (Sigma), and the 'advantage RT-for-PCR kit' (BD Biosciences) was used for cDNA synthesis, both according to the manufacturer's instructions.

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis

Amplifications were conducted on an iCycler iQ (Bio-Rad) with the qPCR Mastermix Plus for SYBR Green I (Eurogentec). The abundance of targeted genes transcripts was normalized to *actin* mRNA and set relative to the control plant (C, not exposed, harvested before electromagnetic exposure) according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The accession numbers of targeted genes are: *actin*, BM956640; *calmodulin-N6*, Y14764; chloroplast mRNA-binding protein (*cmbp*), AF106660; and proteinase inhibitor (*pin2*), AY129402.

Results

Exposure of tomato plants to an EMF of 900 MHz, 5 V m^{-1} for 10 min led to changes in abundance of all three stress-related transcripts, *calmodulin-N6*, *cmbp* and *pin2* (Fig. 2, black bars). *Calmodulin-N6* (Fig. 2A) and *cmbp* mRNA (Fig. 2B) accumulated strongly (5.5- and 6.6-fold respectively) by 15 min, declined to levels indistinguishable from those in the shielded plants at 30 min, and showed somewhat weaker accumulation at 60 min (5.3- and 5.1-fold respectively). The *pin2* transcript gave slightly smaller responses, 4.2-fold at 15 min and 3.4-fold at 60 min (Fig. 2C). When plants were totally shielded from the EMF in the aluminum-enclosed culture chamber, the accumulation of mRNA was strongly reduced (Fig. 2, white bars), verifying that the responses did, indeed, result from EMF exposure.

In order to determine if there was a dose-response relationship between the EMF applied and the amount of transcript accumulated, we subjected plants to the dose used in Fig. 2 (5 V m^{-1} for 10 min), a dose of higher amplitude (40 V m^{-1} for 10 min), a dose of shorter duration (5 V m^{-1} for 2 min), and no dose (shielded plants), and measured *pin2* mRNA accumulation (Fig. 3). Furthermore, to determine how rapidly transcript accumulation occurs, plants were also harvested immediately (0 min) and 5 min after EMF exposure. Transcript accumulation was essentially identical at the two higher doses (Fig. 3, black bars and gray bars), being about five-fold at 15 min and four-fold at 60 min, but there was no transcript accumulation at the low dose (Fig. 3, hatched bars) or in the shielded plants (Fig. 3, white bars). No transcript accumulation occurred prior to 15 min (Fig. 3).

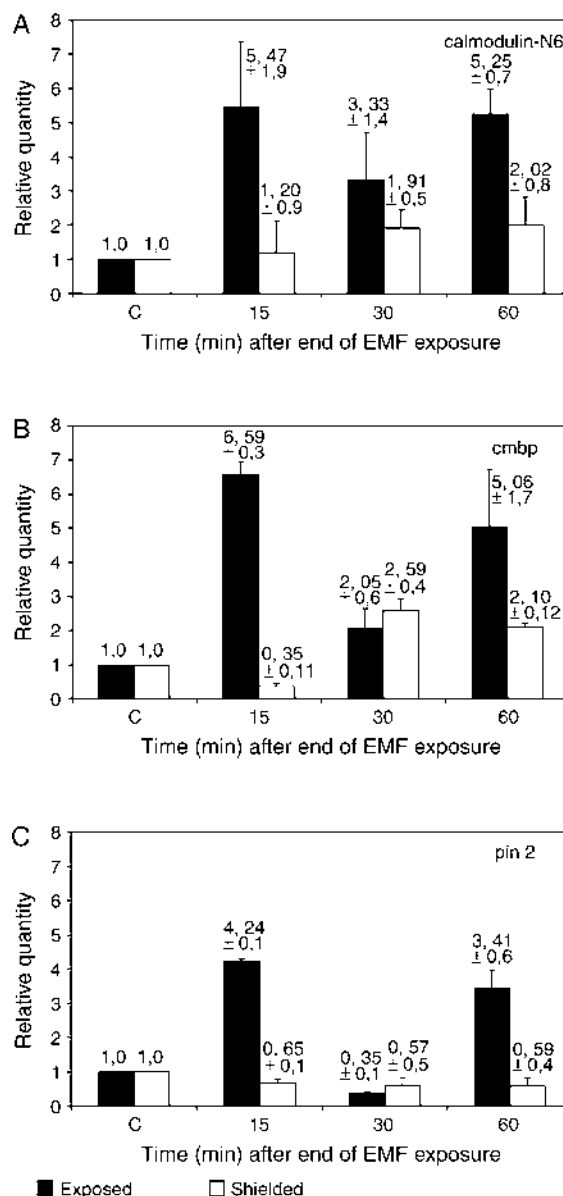


Fig. 2. Abundance of stress-related transcripts after exposure to EMF. Tomato plants were grown as described in Materials and methods and transferred into the MSRC 24 h prior experiment: EMF exposure for 10 min at 900 MHz (black bars), or shielding from exposure (white bars). At different times after exposure, RNA was isolated; the amount of transcript encoding *calmodulin-N6* (A), *cmbp* (B) and *pin2* (C) was quantified by RT-qPCR and normalized to the amount of the housekeeping transcript, *actin*. Values are expressed relative to the control (not exposed plant) value. Bars represent mean values \pm SEM from at least three independent experiments.

Discussion

The purpose of this study was to determine whether short exposure (10 min) of a plant to low-level (5 V m^{-1}) HF-EMF (900 MHz), similar to that used in cell phones, could evoke a rapid biological response at the molecular level

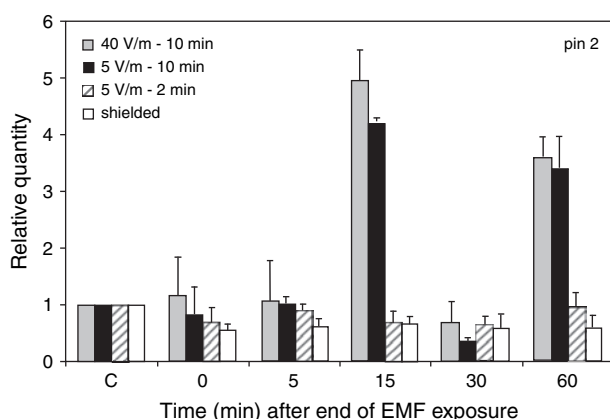


Fig. 3. Abundance of *pin2* transcripts after exposure to different amplitude/duration of EMF. Conditions are the same as Fig. 2. *pin2* transcript were measured and EMF was applied at 40 V m⁻¹ for 10 min (black bars); 5 V m⁻¹ for 10 min (gray bars), or 5 V m⁻¹ for 2 min (hatched bars), or the plants were not exposed (shielded) (white bars).

in tomato plants. We think that EMF could constitute a genuine environmental stimulus/stress for tomato plants, insofar as it evokes rapid and strong molecular responses – the accumulation of stress-related transcripts. Our results tend to show a direct relationship between HF-EMF exposure of tomato plants and responses at the level of gene expression. Although not identical, the kinetics and amplitudes (three- to seven-fold increases) of the targeted transcripts showed striking similarities with the previously described physiologic responses following injurious treatments such as leaf flaming or electrical stimulation (Stankovic and Davies 1997, Vian et al. 1999). Accordingly, we propose here that HF-EMF exposure may constitute an environmental stimulus for the tomato plants.

Calmodulin is the major cell Ca²⁺ receptor and plays a central role in the early events of cell stress responses (Yang and Poovaiah 2003), while *cmbp* and *pin2* are expressed after wounding (flaming, insect bite) (Vian et al. 1999, Zhang et al. 2004). The fact that they all accumulate rapidly indicates that plant stress response pathways are affected by HF-EMF. Surprisingly, all transcripts showed the maximum accumulation at the same time point (15 min after the end of the electromagnetic exposure), and had the same accumulation profile (two distinct peaks separated by a sharp decrease). These similarities (in terms of kinetics and amplitude) indicate the existence of a primary signal able to trigger the molecular response. Such biphasic accumulation of stress transcripts has been observed before in response to flame wounding (Peña-Cortés et al. 1995) and has led to various hypotheses concerning the nature of the primary signal: chemical, hydraulic or electrical, or a combination of these (Davies and Stankovic, 2006). Indeed, it is quite possible that three distinct signals are

involved: the first stimulating the initial synthesis of the transcripts; the second evoking their degradation; and the third stimulating the later burst of synthesis.

The interaction between EMF and the biological sample is not yet understood (Lacy-Hulbert 1998). Frequently, it appears that most of the observed biological responses are due to a ‘thermal’ effect (D’Andrea et al. 2003, Meltz 2003). The energy used here in the electromagnetic exposure was very low (close to 0.1 W dissipated in 200 m³) and did not produce any thermal effect. It is important to note that duration (10 min), amplitude (5 V m⁻¹), homogeneity and isotropy of the EMF exposure were representative of a standard mobile phone emission.

The shielding experiments showed reduced accumulation of the tested transcripts (Fig. 2). This result could also indicate a slower plant response to the remaining EMF (0.5 V m⁻¹) present in the aluminum enclosed culture chamber. This interpretation may explain the consistent accumulation of *cmbp* transcripts (particularly at 30 min) in the shielded chamber.

The amplitude of 40 V m⁻¹ is close to the maximum authorized emission of GSM base antennae according to International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection guidelines (ICNIRP 1998). Surprisingly, no significant differences occurred in the kinetics or levels of *pin2* mRNA accumulation between 5 V m⁻¹ and 40 V m⁻¹ exposure (Fig. 3). Interestingly, decreasing the duration of exposure to EMF (from 10 to 2 min), at a fixed amplitude of 5 V m⁻¹, suppressed the molecular response (Fig. 3). There is therefore no direct link between the amplitude of the stimulation and the amplitude of the plant response. These results suggest the concept of an ‘all-or-nothing’ response, which is characteristic of the action potential (AP), the only ‘genuine’ electrical signal found in plants (Bowles 1995, Davies 2006). However, the propagation of a variation potential (VP), produced after an injurious stimulation, could also be implicated. Specific investigations using electrophysiological methods would be required to determine this. Preliminary results indicate that a rapid signal is actually transmitted through the plant after local stimulation (data not shown).

Our results concerning *calmodulin-N6* suggest that variations in cytoplasmic and membrane-neighboring Ca²⁺ concentrations are early events in plant responses to EMF stimuli. The EMF could interact with moving charges or charged species (Levin 2003) such as hydrogen ions, which are implicated in various biological processes. Moreover, HF-EMF may lead to ion movement, directly or indirectly, and particularly near the plasma membrane (Lacy-Hulbert et al. 1998), and this could initiate the biological response. This ‘ionic’ explanation is particularly attractive when considering the ionic (Ca²⁺, Cl⁻, K⁺) nature of the plant AP (Davies 2006, Davies and Stankovic 2006).

This work suggests the existence of a formal connection between HF-EMF exposure of intact plants and very rapid molecular responses. Assuming that a stress response is really demonstrated, actual damage could occur, but this has not yet been proven (the HF-EMF does not cause any obvious physical tissue damage). The basic claim that low-intensity HF-EMF actually causes a measurable reaction in plant should not be underestimated, or overestimated. In particular, the relevance of these observations to other biological systems must not be overstated. Finally, the ultimate goal of this work is to use microarrays to identify the similarities and differences between microwave-induced genes and those induced by injurious treatments such as flame wounding (Stankovic and Davies 1997, Vian et al. 1999).

Acknowledgements – This work was supported in part by grant RTM0005 ‘Effets biologiques et sanitaires de la radiotéléphonie mobile’ awarded to G. Ledoigt by the Ministère délégué à l’Enseignement supérieur et à la Recherche. The authors thank R. Rechat and L. Chastaing (Blaise Pascal university technical service) for the construction of the culture chamber.

References

- Aldinucci C, Garcia JB, Palmi M, Sgaragli G, Benocci A, Meini A, Pessina F, Rossi C, Bonechi C, Pessina GP (2003) The effect of exposure to high flux density static and pulsed magnetic fields on lymphocyte function. *Bioelectromagnetics* 24: 373–9
- Bowles DJ (1995) Signal transduction in plants. *Trends Cell Biol* 5: 404–8
- Czyz J, Guan K, Zeng Q, Nikolova T, Meister A, Schonborn F, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM (2004) High frequency electromagnetic fields (GSM signals) affect gene expression levels in tumor suppressor p53-deficient embryonic stem cells. *Bioelectromagnetics* 25: 296–307
- D’Andrea JA, Adair ER, de Lorge JO (2003) Behavioral and cognitive effects of microwave exposure. *Bioelectromagnetics Suppl* 6: S39–62
- Dasdag S, Zulkuf Akdag M, Aksen F, Yilmaz F, Bashan M, Mutlu Dasdag M, Salih Celik M (2003) Whole body exposure of rats to microwaves emitted from a cell phone does not affect the testes. *Bioelectromagnetics* 24: 182–8
- Davies E (2006) Electrical signals in plants: facts and hypotheses. In: *Plant Electrophysiology - Theory and Methods*. AG Volkov (ed) Springer, Berlin. pp. 407–422
- Davies E, Stankovic B (2006) Electrical signals, the cytoskeleton, and gene expression: a hypothesis on the coherence of the cellular responses to environmental insult. In: *Communication in Plants. Neuronal Aspects of Plant Life*, Baluska F, Mancuso S, Volkmann D (eds) Springer, Berlin. pp. 309–320
- Elwood JM (2003) Epidemiological studies of radio frequency exposures and human cancer. *Bioelectromagnetics*. Vol. 24. Suppl 6: S63–73
- Gos P, Eicher B, Kohli J, Heyer WD (2000) No mutagenic or recombinogenic effects of mobile phone fields at 900 MHz detected in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectromagnetics* 21: 515–23
- Haarala C, Bjornberg L, Ek M, Laine M, Revonsuo A, Koivisto M, Hamalainen H (2003) Effect of a 902 MHz electromagnetic field emitted by mobile phones on human cognitive function: a replication study. *Bioelectromagnetics* 24: 283–8
- ICNIRP (1998) Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz), *Health Physics* Vol. 74, No 4, pp 494–522
- IEC SC 77B, IEC 61000-4-21 and CISPR/A (2003) *Electromagnetic Compatibility (EMC)-Part 4-21: Testing and Measurement Techniques – Reverberation Chamber Test Methods*, International Electrotechnical Commission (IEC) International standard.
- Irmak MK, Fadillioglu E, Gulec M, Erdogan H, Yagmurca M, Akyol O (2002) Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits. *Cell Biochem Funct* 20: 279–83
- Lacy-Hulbert A, Metcalfe JC, Hesketh R (1998) Biological responses to electromagnetic fields *FASEB J* 12: 395–420
- Levin M (2003) Bioelectromagnetics in morphogenesis. *Bioelectromagnetics* 24: 295–315
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–8
- Marinelli F, La Sala D, Ciccioiti G, Cattini L, Trimarchi C, Putti S, Zamparelli A, Giuliani L, Tomassetti G, Cinti C (2004) Exposure to 900 MHz electromagnetic field induces an unbalance between pro-apoptotic and pro-survival signals in T-lymphoblastoid leukemia CCRF-CEM cells. *J Cell Physiol* Feb; 198: 324–32. Erratum in: *J Cell Physiol* 198: 479–80
- Mashevich M, Folkman D, Kesar A, Barbul A, Koren Stein R, Jerby E, Avivi L (2003) Exposure of human peripheral blood lymphocytes to electromagnetic fields associated with cellular phones leads to chromosomal instability. *Bioelectromagnetics* 24: 82–90
- Meltz ML (2003) Radiofrequency exposure and mammalian cell toxicity, genotoxicity, and transformation. *Bioelectromagnetics*. Vol. 24. Suppl 6: S196–213
- Ottoskog M, Madsén K, (2003) Cell phone performance testing and propagation environment modelling in a reverberation chamber. The 2003 Reverberation Chamber, Anechoic Chamber and OATS Users Meeting, Austin (Texas), April 2003

- Peña-Cortès H, Fisahn J, Willmitzer L (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4106–13
- Stankovic B, Davies E (1997) Intercellular communication in plants: electrical stimulation of proteinase inhibitor gene expression in tomato. *Planta* 202: 402–406
- Tafforeau M, Verdus MC, Norris V, White G, Demarty M, Thellier M, Ripoll C (2002) SIMS study of the calcium-deprivation step related to epidermal meristem production induced in flax by cold shock or radiation from a GSM telephone. *J Trace Microprobe Techn* 20: 611–623
- Tafforeau M, Verdus MC, Norris V, White GJ, Cole M, Demarty M, Thellier M, Ripoll C (2004) Plant sensitivity to low intensity 105 GHz electromagnetic radiation. *Bioelectromagnetics* 25: 403–407
- Tafforeau M, Verdus MC, Norris V, Ripoll C, Thellier M (2006) Memory processes in the response of plants to environmental signals. *Plant Sign Behav* 1: 9–14
- Vian A, Henry-Vian C, Davies E (1999) Rapid and systemic accumulation of chloroplast mRNA-binding protein transcripts after flame stimulus in tomato. *Plant Physiol* 121: 517–24
- Vian A, Roux D, Grand S, Bonnet P, Paladian F, Davies E, Ledoigt G (2006) Microwave irradiation affects gene expression in plants. *Plant Signaling and Behaviour* Vol. 1(2): 67–69
- Weisbrot D, Lin H, Ye L, Blank M, Goodman R (2003) Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biochem* 89: 48–55
- Yang T and Poovaiah BW (2003) Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science* 8: 505–512
- Zhang HY, Xie XZ, Xu YZ, Wu NH (2004) Isolation and functional assessment of a tomato proteinase inhibitor II gene. *Plant Physiol Biochem* 42: 437–44

Research Paper

Microwave Irradiation Affects Gene Expression in Plants

A. Vian^{1,*}

D. Roux¹

S. Girard²

P. Bonnet²

F. Paladian²

E. Davies³

G. Ledoigt¹

¹EA 3296 ERTAC; ²UMR CNRS 6602 LASMEA; Université Blaise Pascal; Aubiere, France

³North Carolina State University; Department of Botany; Raleigh, North Carolina USA

*Correspondence to: Alain Vian; EA 3296 ERTAC; Université Blaise Pascal; 24 Avenue des Landais; 63177 Aubiere, Cedex France; Tel.: 33.473.407.918; Fax: 33.473.407.942; Email: Alain.Vian@univ-bpclermont.fr

Received 11/10/05; Accepted 12/17/05

Previously published online as a *Plant Signaling & Behavior* E-publication: <http://www.landesbioscience.com/journals/psb/abstract.php?id=2434>

KEY WORDS

tomato, microwave, non-ionizing radiation, bZIP, MSRC, EMF

ABBREVIATIONS

<i>LebZIP1</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> basic leucine zipper
MSRC	Mode Stirring Reverberation Chamber
TEM cell	transverse electromagnetic cell
EMF	electromagnetic field

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the French Ministry of Education and Research for the grant RTM 0005 "effets biologiques de la radiotéléphonie mobile" awarded to G.L.

ABSTRACT

The physiological impact of nonionizing radiation has long been considered negligible. However, here we use a carefully calibrated stimulation system that mimics the characteristics (isotropy and homogeneity) of electromagnetic fields present in the environment to measure changes in a molecular marker (mRNA encoding the stress-related *bZIP* transcription factor), and show that low amplitude, short duration, 900 MHz EMF evokes the accumulation of this mRNA. Accumulation is rapid (peaking 5–15 min after stimulation) and strong (3.5-fold), and is similar to that evoked by mechanical stimulations.

INTRODUCTION

High frequency nonionizing radiation is becoming increasingly common in the environment because of the exponential use of mobile phone technology and wireless communication devices. While many reports point out its lack of effects on living organisms,^{1,2} it can be argued that most studies have used unsuitable stimulation devices, primarily TEM-cells,³ custom-made tools^{4,5} or even commercial cell phones,⁶ and address the problem at a very general level with little concern for underlying molecular-level events.⁷ Most stimulation devices are inadequate, since they emit a signal as a plane wave with a fixed polarization and incidence. Studies have therefore been undertaken to develop appropriate technology for EMF studies on living systems by adapting reverberating chambers, which are widely used in acoustics. This has led to the Mode Stirring Reverberation Chamber (MSRC), a facility specially designed to create isotropic and homogeneous EMF that irradiates the subject from all directions. The reflections of the original signal on the metallic walls of the chamber (that isolates the subject from external radiation) randomize the polarization of the EMF without influencing its amplitude (homogeneity). This mimics Nature, where there are multiple reflections and diffractions of EMF from buildings, mountains and trees. Thus, this equipment is extremely well suited to study the effect of EMF on life.

Two aspects of these biological experiments need special attention: the organism itself and the parameter, preferably a molecular marker,⁸ to be studied. Plants may be appropriate experimental subjects, in the sense that they are highly sensitive to environmental signals⁹⁻¹¹ and plant studies raise less emotional concern than studies on animals or humans. Moreover, radiation from a GSM telephone or from a 105 GHz Gunn oscillator has been shown to have an effect comparable to that of a variety of environmental stimuli (such as manipulation stress, drought, wind and cold shock) in inducing physiological modifications (production of numerous epidermal meristems in the hypocotyls) or modifications of the proteome (pI shift, appearance or disappearance of a spot in 2D electrophoresis) in flax seedlings;¹²⁻¹⁵ modifications of the proteome have also been observed in *Arabidopsis* seedlings subjected to stimuli such as cold shock or radiation from a GSM telephone.¹⁵ Here, we have studied the effect of mobile-phone intensity microwave radiation on another type of plant (the tomato), taking a particular care to the conditions of irradiation and studying the accumulation of a stress-related transcript (mRNA) that responds very rapidly to even small environmental stimulations.¹⁶ We are going to show that such microwave radiation enhances accumulation of the transcript encoding a specific, wound-related transcription factor, *LebZIP1*.¹⁷

MATERIAL AND METHODS

Plant culture and treatment. Tomato plants (*Lycopersicon esculentum* cv VFN-8) were germinated in the greenhouse and transferred to an EMF-permeable culture chamber and grown under controlled conditions (Light/Dark 16 h/8 h 26°C/21°C, light intensity of 175 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ at plant level) for three weeks, until the 4th terminal leaf had formed. The culture chamber containing the plants was transferred to the stimulation chamber at least 18h before treatment. Stimulation was made using the MSRC (Fig. 1A). This facility is a large room (8.4 x 6.7 x 3.5 m, about 195 m³) enclosed in double-layered metal walls which act as a Faraday cage to protect the experiment from external (environmental) EMF background. For plant stimulation, a single frequency (900 MHz) was produced by a signal synthesizer (Anritsu model 68147C), verified with a signal analyser (Anritsu model MS2665C) and emitted into the chamber with a log-periodic emission antenna. A rotary stirrer was used to create different patterns of multiple reflections on the chamber walls, thus randomizing the polarization of the electromagnetic waves. The resulting electromagnetic field is statistically isotropic and homogeneous within a defined “working” volume. The stimulation (5 V/m, 10 min) was given to the plant in the middle of the light period. The 4th terminal leaf was collected at various times after the end of the stimulation and immediately frozen in liquid nitrogen. Control plants were collected before stimulation. Because of the limited size of the culture chamber, only one plant could be used for each time point. For some experiments, the culture chamber was shielded in a polymer mesh covered with an aluminium layer that causes a 45 dB signal attenuation at 900 MHz (more than 87%).

RNA isolation and quantitative PCR. RNA was isolated from frozen tissue using Tri-Reagent (Sigma) and total RNA (1 μg) was used to drive cDNA synthesis (Advantage RT for PCR, BD Bioscience) for 1 h at 42°C both according to the manufacturers’ instructions. The cDNA was diluted 5-fold and used as DNA template for quantitative PCR analysis (Two step qPCR Mastermix Plus for SYBR-Green, Eurogentech). The chosen primers (sense: 5'-GGGATGGA-GAAGTTTGGTGGTGG-3' Anti-sense: 5'-CTTCGACCAAGGG-ATGGTGTAGC-3') amplify just *LebZIP1* cDNA¹⁷ (Genbank accession number AF176641). The reactions were performed and analysed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method¹⁸ with actin as internal control, and values calculated relative to the nonexposed control plants. Actin and *LebZIP1* fragments amplify with the same efficiency in our experimental conditions (data not shown).

RESULTS AND DISCUSSION

Experiments were conducted inside the MSRC within the working volume (Fig. 1A, grey area) containing the plant culture chamber, where the EMF was statistically isotropic and homogeneous (Fig. 1B, a) in contrast to a polarized, nonhomogeneous EMF (Fig. 1B, b). These characteristics were determined by measuring the values of the standard deviations (σ_x , σ_y and σ_z) of the three spatial components

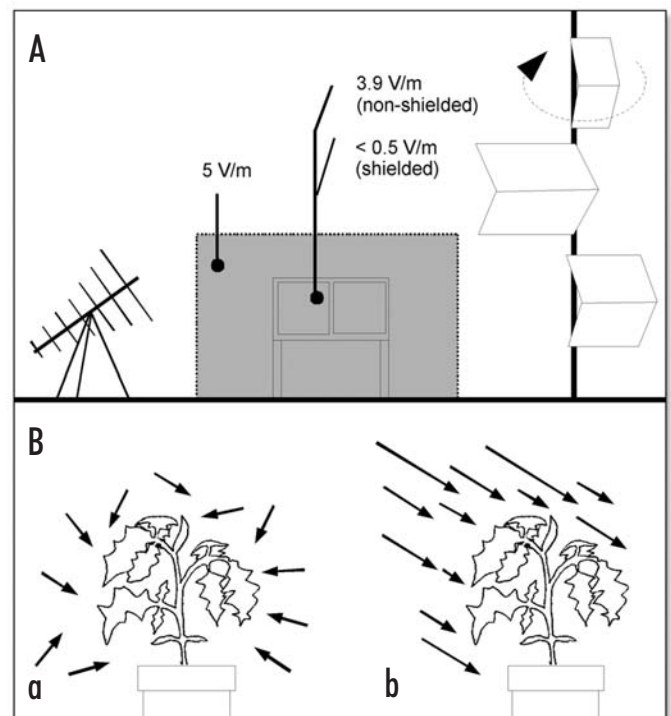


Figure 1. (A) The mode stirring reverberation chamber. This is a large room with metal walls (dark lines) to exclude external EMF, an antenna (lower left) to emit tunable EMF, a rotary stirrer to make the EMF homogeneous (right side) and a plant culture chamber placed within the working volume (gray area). (B) Schematic representation of EMF types. a, non-polarized (isotropic) and homogeneous field, where the field components align in all possible directions and the field has the same amplitude at all points. b, polarized, nonhomogeneous field, where the field components align in a single direction while the amplitude varies (heterogeneity).

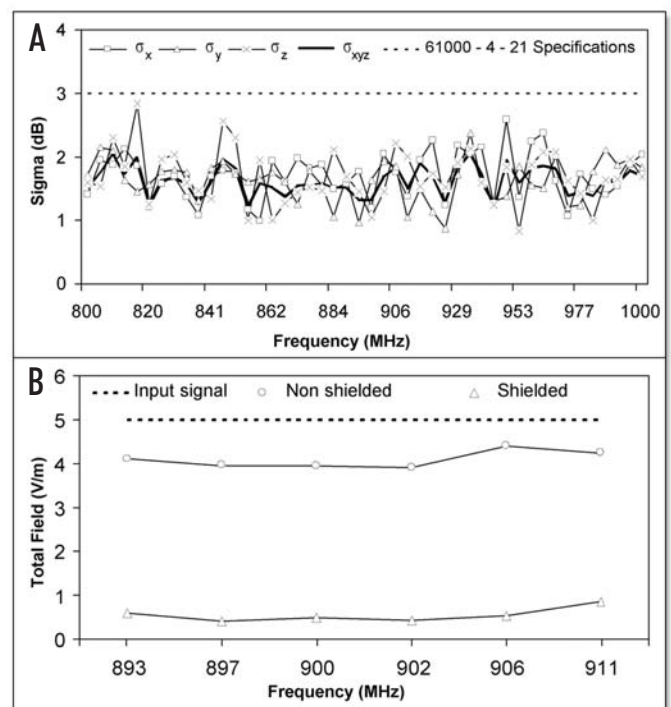


Figure 2. Field characteristics in the plant culture chamber. The tunable antenna was used to generate EMF of 5 Vm⁻¹ from 800–1000 MHz (A), or 893–911 MHz (B). (A) Standard deviation of amplitude for the total field (σ_{xyz} , bold line) and for each of the Cartesian axes (σ_x , σ_y , σ_z); dashed line: 3dB limit specified by the IEC 61000-4-21 standard. (B) Effective values measured within the nonshielded (○) and shielded (Δ) culture chamber. Dashed line: 5 V/m input signal.

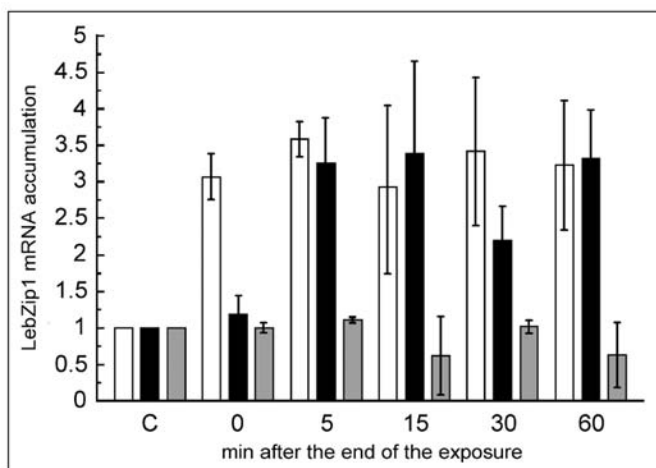


Figure 3. Accumulation of *LebZIP1* transcript after EMF-stimulation in the nonshielded culture chamber. Plant show either an immediate response (white bars) or a 5 min delayed response (black bars). Plants stimulated in the shielded culture chamber (gray bars). Each value is expressed relative to the nonexposed control (C) and normalized to the actin mRNA and is the average of at least 3 independent repetitions \pm the standard error.

of the electric field in 8 locations within the culture chamber, and the σ_{xyz} calculated from these 24 components.

To verify the isotropy and homogeneity of the EMF, we excited the chamber with single frequency signals varying from 800 to 1000 MHz and made 18 measurements of the generated field per stirrer rotation for each tested frequency and the results are shown in Figure 2A. The standard deviation for each of the three spatial components (σ_x , σ_y and σ_z) and of the combined (σ_{xyz}) never exceeded the 3 dB limit listed in the 61000-4-21 specification,¹⁹ proving that the field quality is not affected by interactions with the culture chamber walls. However, they do cause a signal attenuation of about 20%, since the input amplitude was 5 V/m (Fig. 2B dashed line), whereas the measured amplitude inside the chamber was 3.9 V/m (Fig. 2B, “non-shielded”). Furthermore, the shielding material decreased the field amplitude by 87% inside the chamber 0.5 V/m (45 dB attenuation) at 900 MHz (Fig. 2B, “shielded”). In the unshielded culture chamber, the plants were therefore exposed to an EMF similar to that occurring in the natural environment in terms of amplitude, isotropy and homogeneity, indicating that the MSRC is an outstanding facility to generate such conditions.

Exposure of the plant to EMF induced a rapid (maximum after 5–15 min) and strong (3.5-fold) accumulation of the stress-related *LebZIP1* mRNA in the 4th terminal leaf (Fig. 3). In some experiments, the accumulation began immediately after the end of the stimulation (Fig. 3, white bars), while in others there was a short delay (Fig. 3, black bars). In all cases, the response was maximal at 5–15 min after the end of stimulation, in some cases (black bars) declined somewhat at 30 min, but generally remained at high levels until 60 min. Since, space limitations within the MSRC precluded the use of more than 1 plant (1 leaf) per time point, and since each experiment used a different batch of plants, we are amazed at the relative consistency of the results. When plants were placed in the shielded culture chamber, no significant accumulation of *LebZIP1* transcript was seen (Fig. 3, gray). These results indicate that: (1) the cellular responses are directly linked to exposure of plants to the EMF; and (2) that the

remaining EMF (0.5 V/m) present in the shielded culture chamber is insufficient to evoke *LebZIP1* mRNA accumulation. Although the treated tissue did not display any apparent damage, the rapidity and amplitude of the response are comparable to those observed after strong stimulation such as flaming.¹⁷

These results are quite surprising and strongly question the mechanism of interaction between the plant and the EMF. The energy associated with the EMF radiation is extremely low²⁰ and insufficient to evoke plant defence mechanisms involving the genesis of free radicals or molecule ionization. Variations of cytosolic Ca^{2+} concentration have been implicated after EMF stimulation¹³ and might constitute the initial signal that evokes the observed molecular responses. Thermal effects²¹ are unlikely to arise considering the frequency (900 MHz) and the very low power (0.1 W) dissipated in the large volume of the MSRC. The response is therefore triggered by a mechanism which is unlikely to be based on a simple energy transfer from the wave to the plant. The amplitude (3.9 V m^{-1}) of the signal that evoked this rapid stress-related response is within the range used for mobile phone communication or to the EMF background present in an urban environment.

The major points arising from this study are that high frequency low amplitude EMF cause enhanced expression of at least one plant-wound gene. This response is reproducible and exceedingly rapid, in all instances peaking within 15 min following the end of exposure. This rapid response and its suppression by an EMF-proof shield allows us to make a formal link between the EMF stimulation and the accumulation of the *bZIP* mRNA.

References

- De Seze R, Fabro-Peray P, Miro L. GSM radiocellular telephones do not disturb the secretion of antepituitary hormones in humans. *Bioelectromagnetics* 1998; 19:271-8.
- Hietanen M, Hämäläinen AM, Husman T. Hypersensitivity symptoms associated with exposure to cellular telephones: No causal link. *Bioelectromagnetics* 2002; 23:264-70.
- Nikolovski N, Fröhlich J, Samaras T, Schuderer J, Kuster N. Reevaluation and improved design of the TEM cell in vitro exposure unit for replication studies. *Bioelectromagnetics* 2005; 26:215-24.
- Laval L, Leveque P, Jecko B. A new in vitro exposure device for the mobile frequency of 900 MHz. *Bioelectromagnetics* 2000; 21:255-63.
- Rao RR, Kisaalita WS. A single magnetic field exposure system for sequential investigation of real time and downstream cellular responses. *Bioelectromagnetics* 2004; 25:27-32.
- Besset A, Espa F, Dauvilliers Y, Billard M, De Seze R. No effect on cognitive function from daily mobile phone use. *Bioelectromagnetics* 2005; 26:102-8.
- Sienkiewicz ZJ, Blackwell RP, Haylock RGE, Saunders RD, Cobb BL. Low-level exposure to pulsed 900 Mhz microwave radiation does not cause deficits in the performances of a spatial learning task in mice. *Bioelectromagnetics* 2000; 21:151-8.
- De Mattei M, Gagliano N, Moscheni C, Dellavia C, Calastrini C, Pellati A, Gioia M, Caruso A, Stabellini G. Changes in polyamines, *v-myc* and *c-fos* gene expression in osteoblast-like cells exposed to pulsed electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 2005; 26:207-14.
- Depège N, Thonat C, Coutand C, Julien JL, Boyer N. Morphological responses and molecular modifications in tomato plants after mechanical stimulation. *Plant Cell Physiol* 1997; 38:1127-34.
- Verdus MC, Thellier M, Ripoll C. Storage of environmental signals in flax: Their morphogenetic effect as enabled by a transient depletion of calcium. *Plant J* 1997; 12:1399-1410.
- Vian A, Henry-Vian C, Davies E. Rapid and systemic accumulation of chloroplast mRNA binding protein transcripts after flame stimulus in tomato. *Plant Physiol* 1999; 121:517-24.
- Tafforeau M, Verdus MC, Charlonet R, Cabin-Flaman A, Ripoll C. Two-dimensional electrophoresis investigation of short term response of flax seedlings to cold shock. *Electrophoresis* 2002; 23:2534-40.
- Tafforeau M, Verdus MC, Norris V, White G, Demarty M, Thellier M, Ripoll C. SIMS study of the calcium-deprivation step related to epidermal meristem production induced in flax by cold shock or radiation from a GSM telephone. *J Trace Microprobe Techn* 2002b; 20:611-23.
- Tafforeau M, Verdus MC, Norris V, White GJ, Cole M, Demarty M, Thellier M, Ripoll C. Plant sensitivity to low intensity 105 GHz electromagnetic radiation. *Bioelectromagnetics* 2004; 25:403-7.
- Tafforeau M, Verdus MC, Norris V, Ripoll C, Thellier M. Memory processes in the response of plants to environmental signals. *Plant Sign Behav* 2006; 1:9-14.
- Vian A, Henry-Vian C, Schantz R, Ledoigt G, Frachisse JM, Desbiez MO, Julien JL. Is membrane potential involved in calmodulin gene expression after external stimulation in plants? *FEBS Lett* 1996; 380:93-6.

17. Stankovic B, Vian A, Henry-Vian C, Davies E. Molecular cloning and characterization of a tomato cDNA encoding a systematically wound-inducible bZIP DNA-Binding protein. *Planta* 2000; 212:60-6.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative *PCR* and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Methods* 2001; 25:402-8.
19. IEC: International Electrotechnical Commission. Electromagnetic compatibility. 2002, (Part 4 Section 21, Reverberation Chamber Test Methods, Standard IEC 61000-4-21, Draft CD2).
20. Challis LJ. Mechanisms for interaction between RF fields and biological tissues. *Bioelectromagnetics supp* 2005; 26:S98-106.
21. Blank M, Goodman R. A biological guide for electromagnetic safety: The stress response. *Bioelectromagnetics* 2004; 25:642-6.